

**PENGARUH PEMBERIAN JUS JAMBU BIJI (*Psidium
Guajava L*) TERHADAP KADAR ION NITRIT DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGIK PANUS
SENDI *ADJUVANT INDUCED ARTHRITIS*
TIKUS WISTAR**

Studi terapi *adjuvant induced arthritis* in vivo pada tikus strain wistar

***THE EFFECT OF GUAVA (*Psidium Guajava L*) JUICE ON NITRITE
ION CONCENTRATION AND THE HISTOPATHOLOGY
PANNUS APPEARANCE IN JOINT ADJUVANT INDUCED
ARTHRITIS IN WISTAR RATS***



TESIS
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S2

MAGISTER ILMU BIOMEDIK

Wiralis
G4A006004

P R O G R A M P A S C A S A R J A N A
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2008

**PENGARUH PEMBERIAN JUS JAMBU BIJI (*Psidium Guajava* L)
TERHADAP KADAR ION NITRIT DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGIK PANUS SENDI *ADJUVANT INDUCED*
ARTHRITIS TIKUS WISTAR**

Wiralis
G4A006004

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Prof. Dr. H. Soebowo, Sp.PA (K)
NIP. 130 352 549

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa Tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan Lembaga Pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan didalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 10 Juni 2008

Wiralis

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Wiralis,S.TP
NIM : G4A006004
Tempat/tanggal lahir : Kendari, 12 Desember 1965
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Wanita

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Tawarotebota - Kendari Lulus tahun 1977
2. SMP Nasional – Ujungpandang Lulus tahun 1981
3. SMA Frater – Kendari Lulus tahun 1984
4. Sekolah Pembantu Ahli Gizi - Kendari Lulus tahun 1986
5. Akademi Gizi – Ujungpandang Lulus tahun 1993
6. Teknologi Pangan dan Gizi- Tek Pertanian – IPB Lulus tahun 1998
7. Magister Ilmu Biomedik-UNDIP- Semarang 2006- sekarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 1987- 1990 : Gizi Puskesmas Palangga- Kendari
2. Tahun 1993-1994 : Gizi Puskesmas Pondidaha-Kendari
3. Tahun 1994-1996 : Staf Pengajar SPAG Kendari
4. Tahun 1998-2006 : Dosen Akademi Gizi Kendari

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang tua:

Ayah : Mugaria

Ibu : Oktovine Kustanse

2. Nama Suami : La Ode Basirun, SH

3. Anak : La Ode M Daffa Izzul Haqq

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, Segala Puji hanya milik ALLAH

Subhanallah, Mahasuci ALLAH atas segala Rahmat, Kekuatan, Taufiq, Hidayah, Innayah dan IlmuNYA, sehingga kami dapat menyelesaikan tugas dalam rangka mengikuti Program Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana pada Universitas Diponegoro Semarang.

Tesis ini dibuat dalam rangka memenuhi sebagian persyaratan derajat sarjana S2 pada Magister Ilmu Biomedik yang kami tempuh.

Judul tesis ini adalah **Pengaruh pemberian jus jambu biji (*Psidium Guajava L*) terhadap kadar ion nitrit dan gambaran histopatologik panus sendi adjuvant induced arthritis tikus Wistar**. Tesis ini diharapkan dapat memberi sumbangan pengetahuan tentang manfaat jus jambu biji pada artritis reumatoid khususnya kadar ion nitrit dan gambaran histopatologik sendi.

Melalui kesempatan ini, kami menyampaikan penghargaan yang setinggi-tinggihnya dan rasa terimakasih Kepada:

1. **Prof. DR. dr. Soesilo Soebowo, MmedSc, Sp.Aand (K)**, Rektor Universitas Diponegoro Semarang atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami dalam rangka menyelesaikan Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik.
2. **Prof. Drs. Y Warella, M.PA, PhD**, Direktur Pasca Universitas Diponegoro Semarang atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami dalam

rangka menyelesaikan Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik.

3. **Prof. Dr. Soebowo, Sp.PA (K)**, Ketua Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro Semarang atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami dalam rangka menyelesaikan Program studi ini.
4. **dr. Soejoto, Sp.KK (K)** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang Semarang atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami dalam rangka menyelesaikan Program studi ini.
5. **Prof. DR. dr. Endang Purwaningsih, MPH, Sp.GK**, selaku pembimbing satu dalam penelitian ini, atas segala waktu, tenaga dan bimbingan yang diberikan sehingga tesis ini dapat selesai.
6. **Prof. dr. Edi Dharmana, PhD, Sp.Park**, selaku pembimbing kedua dalam penelitian ini, atas segala waktu, tenaga dan bimbingan yang diberikan sehingga tesis ini dapat selesai
7. **DR. drh, Auliani'aam, DES**, selaku pembimbing laboratorium dalam penelitian ini, atas segala waktu, tenaga dan bimbingan yang diberikan sehingga tesis dapat selesai
8. Kepada Guru-Guru kami, **Prof. DR. dr. Soesilo Soebowo, MmedSc, Sp.And (K)**; **Prof. Prof. DR. dr. Prof. DR. dr. Endang Purwaningsih, MPH, Sp.GK**; **Prof. dr. Edi Dharmana, PhD, Sp.Park** ; **Prof. dr. H.M. Sulckan, MSc, Sp.GK**; **Prof. DR. dr. Ag. Soemantri, Sp.A(K)**; **Prof. DR. dr. Sarjadi, Sp.PA(K)**; **Prof. DR.dr. Suharjo Hadisaputro, Sp.PD**; **Prof. DR. dr. H. Tjahjono, Sp.PA(K) FIAC**; **Prof. dr. Siti Fatimah Muis, Msc.**

**Sp.GK; DR. Norma Afianti, Msc; /rof. Dr. Lisyani Suromo, Sp.PK(K);
prof. DR. dr. H. Hertanto WS, MS, SP.GK; dr. Pudjadi,SU; dr. Kusmiyati
DK, M.Kes; dr. Darmono SS, MPH, Sp.GK; dr. Imam Budiwiyono,
SP.PK; dr. Noor Wijayahadi,M.Kes,PhD; dr. Niken Puruhita, M.Med.Sc;
dr. Purwanto, Sp.PK; dr. Martha, Msc;**

9. Karyawan dan karyawan Program Biomedik, Biotek dan bagian Patologi Anatomi RS Kariadi yang telah membantu selama ini dan membimbing praktek.
10. Karyawan dan karyawan laboratorium Biotek Universitas Brawijaya Pak Armaji, Novi, Ina, Santi, Meri, Ima, Edi dan yang lainnya
11. Sahabat seperjuangan pada Program Biomedik angkatan 2006, dr. M. Purnomo, dr. Qotrunnada dan dr Rosa, yang telah memberikan motivasi dan bantuan moril serta materilnya.
12. Departemen Kesehatan, khususnya PPSDM yang memberikan biaya pendidikan serta sejawat di Politeknik Kesehatan Kendari yang telah memberikan kesempatan dan dukungannya, khususnya alm. Ir Multono, Pak Teguh, Pak Petrus, Pak Purnomo, Tante Ria, sahabatku Suarni, Hariani, Rosnah, Nancy, Risma, Rita, Fonnies, Supiati, Tress, Made, Labanudi, Imanudin, Masrif dan lainnya yang tak dapat disebutkan satu persatu.
13. Ibu dan saudara-saudara tercinta Buinomo sekeluarga, Jasrim sekeluarga, Muslim sekeluarga, Basuki sekeluarga yang telah memberikan dukungan moril dan materil sehingga kami dapat menyelesaikan studi.

14. Suamiku tercinta LD Basirun dan anakku tersayang Izul, kusampaikan dari lubuk hati yang paling dalam, rasa terimakasih atas kesabaran, pengorbanan, jerih payah yang tidak mengenal lelah serta doa-doamu yang tulus dan tak pernah putus asa sampai saat ini, semua itu merupakan bekal dalam mengarungi lautan ilmu, menghadapi rintangan dan cobaan.

Kami menyadari tesis ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kami mengharapkan saran dan kritik untuk kesempurnaan tesis ini.

Akhir kata, kami mohon maaf atas segala kesalahan dan kehilafan yang kami sengaja maupun tidak disengaja, baik itu perkataan atau perbuatan yang kami lakukan selama kami menyelesaikan tesis ini dan dalam menempuh studi.

Semarang, Juli 2008

Peneliti

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan	iii
Riwayat Hidup	iv
Kata Pengantar	vi
Daftar Isi	x
Daftar tabel	xiv
Daftar Gambar	xv
Daftar Grafik	xvi
Daftar Bagan	xvii
Daftar Lampiran	xviii
Daftar Singkatan	xix
Ringkasan	xxi
<i>Abstract</i>	xxii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.1.1. Rumusan Masalah	3
1.1.2. Keaslian Penelitian	4
1.1.3. Manfaat Penelitian	8
1.2. Tujuan Penelitian	8
1.2.1. Tujuan Umum	8
1.2.2. Tujuan Khusus	8
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Arthritis rheumatioid	9

2.1.1. Definisi	9
2.1.2. Epidemiologi	10
2.1.3. Fisiologi dan Anatomi	11
2.1.4. Patofisiologi	12
2.1.5. Etiologi	13
2.1.6. Patogenesis	13
2.1.7. Manifestasi Klinik	20
2.2. <i>Adjuvant induced arthritis</i> (AIA)	21
2.3. Ion Nitrit	24
2.4. Gambaran Histopatologik	25
2.5. Jus Jambu Biji	27
2.5.1. Taksonomi	27
2.5.2. Morfologi	28
2.5.3. Kandungan jambu Biji	29
2.5. Hubungan stres oksidatif, antioksidan dan <i>arthritis rheumatoid</i>	30
2.5.1. Stres Oksidatif	30
2.5.2. Antioksidan	32
 BAB 3. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	 36
3.1. Kerangka Teori	36
3.2. Kerangka Konsep	37
3.3. Hipotesis	37
 BAB 4. METODE PENELITIAN	 38
4.1. Rancangan Penelitian	38
4.2. Ruang Lingkup Penelitian	38
4.2.1. Subyek Penelitian	38
4.2.2. Waktu dan Tempat Penelitian	39

4.3. Kriteria Inklusi dan Eksklusi	39
4.3.1. Kriteria Inklusi	39
4.3.2. Kriteria Eksklusi	39
4.4. Randomisasi	39
4.5. Variabel Penelitian	40
4.5.1. Variabel Independen	40
4.5.2. Variabel Dependen	40
4.6. Definisi Operasional	40
4.6.1. Variabel Independen	40
4.6.2. Variabel Dependen	40
4.6.3. Variabel Karakteristik Klinik	41
4.7. Kerangka Kerja Penelitian	42
4.8. Bahan dan Materi	42
4.9. Alat/Instrumentasi	43
4.10. Prosedur Kerja	43
4.10.1. Imunisasi CFA	43
4.10.2. Jus Jambu Biji	44
4.10.3. Pemeriksaan Ion Nitrit	45
4.10.4. Pemeriksaan Gambaran Histopatologik	46
4.10.4.1. Dekalsifikasi Tulang	46
4.10.4.2. Proses Jaringan	46
4.10.4.3. Pengecatan Hematosilin Eusin (HE)	47
4.11. Pengumpulan dan Pengolahan data	48
4.12. Analisis Data	48
 BAB 5. HASIL	 50
5.1. Karakteristik Sampel	50
5.1.1. Gambaran Umum Penelitian	50
5.1.2. Pengaruh imunisasi CFA pada <i>Adjuvant Induced Arthritis</i>	

(AIA)	50
5.2. Pengaruh perlakuan terhadap kadar Ion Nitrit	54
5.3. Pengaruh perlakuan terhadap gambaran histopatologik panus sendi AIA .	57
 BAB 6. PEMBAHASAN	 63
6.1. Pengaruh imunisasi CFA pada adjuvant induced arthritis (AIA)	63
6.2. Pengaruh perlakuan terhadap kadar ion nitrit	64
6.3. Pengaruh perlakuan terhadap gambaran histopatologik panus sendi AIA..	66
6.4. Pengaruh aspirin dan jambu biji terhadap <i>adjuvant induced Arthritis</i>	67
6.5. Keterbatasan dalam Penelitian	71
 BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	 72
7.1. Kesimpulan	72
7.2. Saran	72
 DAFTAR PUSTAKA	 73
LAMPIRAN	78

DAFTAR TABEL

Nomor

Halaman

1.	Penelitian yang digunakan sebagai dasar penyusunan penelitian tesis	4
2.	Fase Perkembangan Patogenesis <i>Arthritis Rheumatoid</i>	18
3.	Hasil uji deskriptif volume kaki AIA kelompok perlakuan	51
4.	Hasil uji deskriptif kadar ion nitrit serum AIA kelompok perlakuan	54
5.	Nilai p kadar ion nitrit AIA tikus dengan uji LSD	56
6.	Hasil uji deskriptif skor ukuran panus sendi AIA tikus Wistar	57
7.	Rerata ranking mean skor panus sendi AIA tikus Wistar	61
8.	Nilai p skor panus sendi AIA tikus Wistar	62

DAFTAR GAMBAR

Nomor

Halaman

1.	Mekanisme Inflamasi yang terlibat dalam Proses Arthritis Reumatoid	16
2.	Perbandingan sel normal dan kondisi hipoksia	17
3.	Infiltrasi Sel Imun Pada Proses Inflamasi	26
4.	Foto Sampel Penelitian Hari ke-0 dan Hari ke-21	52

DAFTAR GRAFIK

Nomor	Halaman
1. Perubahan volume kaki pada awal penelitian (hari ke-0), setelah imunisasi (hari ke-21) dan setelah perlakuan (hari ke-35)	48
2. Boxplot kadar ion nitrit serum AIA dalam $\mu\text{mol/ml}$	55
3. Boxplot ukuran panus sendi AIA kelompok perlakuan	59
4. Gambaran ukuran panus sendi AIA kelompok perlakuan	60

DAFTAR BAGAN

Nomor

Halaman

1.	Patogenesis arthritis rheumatoid	15
2.	Hubungan faktor-faktor yang mempengaruhi produksi ion nitrit Dan gambaran patohistologik panus	36
3.	Kerangka konsep penelitian	37
4.	Kerangka kerja penelitian	41

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Hasil Analisis Jambu Biji	78
2.	Cara Kerja Purifikasi Serum	79
3.	Cara Kerja Pengukuran Ion Nitrit dengan metode Griess	80
4.	Hasil Pengukuran Berat Badan Sampel dan Uji hasil uji	81
5.	Hasil Pengukuran Volume Kaki dan Uji statistik	82
6.	Hasil Pengukuran Kadar Ion Nitrit dan Uji statistik	89
7.	Skor gambaran panus sendi AIA dan uji statistik	93
8.	Dokumentasi Kegiatan	106

DAFTAR SINGKATAN

AS	: Amerika Serikat
AAF	: <i>America Arthritis Foundation</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
AIA	: <i>Adjuvant Induced Arthritis</i>
C3	: <i>Complement 3</i>
C5	: <i>Complement 5</i>
CD4	: <i>Cluster of Differentiation-4</i>
COX	: <i>Cytochrome-oxidase</i>
CFA	: <i>Complete Freund's Adjuvant</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDRFs	: <i>Endothelium derived relaxing factor</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immuno Assay</i>
eNOS	: <i>Endothelial specific nitric oxide synthase</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
H2O2	: <i>Hydrogen peroxide</i>
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
HLA-DR4	: <i>Human Leucocyte Antigen- haplotype DR-4</i>
MHC class II	: <i>Major Histocompatibility Class II</i>
i. NOS	: <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IL-1	: Interleukin-1
IL-6	: Interleukin -6
IL-8	: Interleukin -8
IgG	: Immunoglobulin G
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
nNOS	: <i>Neural specific nitric oxide synthase</i>
NO	: Nitric Oxide/Nitric oxide
NOS	: <i>Nitric Oxide synthase</i>

NSAIDs	: <i>Non-steroid anti inflamasi drugs</i>
NHIS	: National Health Interview Survey
O ₂	: Oksigen
RFs	: <i>Rheumatoid Factor</i>
ROS	: <i>Reactive oxigen spesies</i>
RNS	: <i>Reactive nitrogen spesies</i>
SOD	: <i>Superoksid dismutase</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor- α</i>
VCAM-1	: <i>Vascular Cell molecul-1</i>

RINGKASAN

Latar belakang: Pada *Adjuvant induced arthritis* (AIA) kadar NO meningkat oleh inflamasi dan oksidan. Karakteristik AIA seperti bengkak pada sendi, hiperplasia sinovium, pembentukan panus, dihubungkan dengan destruksi tulang dan kartilago. Jambu biji (*Psidium Guajava* L) mengandung fitonutrien yang diduga sebagai sumber antioksidan dan antiinflamasi.

Tujuan: Mengetahui pengaruh pemberian jus jambu biji terhadap kadar ion nitrit dan gambaran histopatologik panus sendi *adjuvant induced arthritis* tikus wistar.

Metode: Studi eksperimen laboratorik dengan desain *randomized post test only control group* pada 25 ekor tikus strain *wistar*. Sampel terbagi 5 kelompok yaitu kelompok K-; kelompok K+ (aspirin); P1 (jus jambu biji 1 gram/hari); P2 (jus jambu biji 2 gram/hari) dan P3 (jus jambu biji 3 gram/hari). Dilakukan pemeriksaan ion nitrit serum sebagai gambaran aktivitas NO dengan metode Griess, gambaran panus sendi dengan pengecatan HE. Data dianalisis dengan *One Way Anova test* dan *Kruskal-Wallis Test* dengan derajat kemaknaan $P < 0,05$.

Hasil: Ada perbedaan kadar ion nitrit pada kelompok perlakuan dibuktikan dengan $p = 0,00$. Hasil uji LSD diketahui kadar ion nitrit kelompok kontrol (+) tidak berbeda dengan kelompok perlakuan jus jambu biji 2 gram/hari dengan $p > 0,05$. Ada perbedaan gambaran histologik panus terhadap kelompok perlakuan dengan $p = 0,01$. Hasil uji *Mann-Whitney* diketahui kelompok kontrol (K-) berbeda dengan kelompok perlakuan aspirin (K+), perlakuan jus jambu biji 1 gram/hari, perlakuan jus jambu biji 2 gram/hari dan perlakuan jus jambu biji 3 gram/hari.

Simpulan: Pemberian jus jambu biji berpengaruh dalam menghambat produksi kadar ion nitrit dan gambaran histopatologik panus sendi tikus Wistar yang diinduksi dengan CFA.

Kata Kunci: ajuvan arthritis, jambu biji, NO dan panus

ABSTRACT

BACKGRAUND: Nitrite ion increases in adjuvant arthritis. It has been associated with the activities of nitrite oxide (NO). Nitrite oxide mediates inflammation and oxidant, it is a progressive joint disease characterized by hyperplasia sinovial and invasion pannus associated with an destruction of bone and cartilage. Jambu biji (*Psidium Guajava L*) is known to be the source of antioxidant and antiinflammation.

Aim: To find out the difference nitrite ion and histopathological feature of joint in adjuvant induced arthritis rats after administration of jambu biji (*Psidium Guajava L*) juice.

Design and Method: An experimental study had been done using a randomized post test only control group. Twenty five Wistar rats were divided into 5 group. 2 control groups (K- and K+) and 3 treated groups (jambu biji juice 1 gr/day, 2 gr/day and 3 gr/day). Griess was used to assay nitrite ion serum and hematosilin Eusin to assay histopathological pannus of joint. One Way Anova test and mann Withney test were applied for data analysis.

Result: A significant difference in nitrite ion was found among the treated groups ($p:0,00 < 0.05$), but not between the K+ group and 2 gr/day treated group. There is significant difference in pannus feature among the treated groups ($p:0,01 < 0.05$) to K- group, but not among aspirin and jus jambu biji 1-3 grams/day treated groups, .

Conclusion: Jambu biji (*Psidium Guajava L*) juice shows an effect for nitrite ion in consentration and histopathology pannus appearance of joint in adjuvant induced arthritis.

Keyword : : juvant arthritis, Guajava, NO and pannus

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Arthritis rheumatoid merupakan penyakit autoimun yang bersifat inflamasi kronik-sistemik. Inflamasi kronik menyebabkan hipertropi dan penebalan membran pada sinovium, hambatan aliran darah dan nekrosis sel. Penebalan sinovium oleh lapisan jaringan granular membentuk panus yang bersifat destruktif dan menyebabkan inflamasi berlanjut, membentuk jaringan parut yang dapat memacu kerusakan sendi menyebabkan degradasi jaringan ikat terutama pada organ sinovium dan struktur sendi seperti tulang rawan, kapsul fibrosa sendi, ligamen dan tendon yang pada akhirnya menyebabkan deformitas sehingga terjadi kekakuan dan kehilangan fungsi sendi secara permanen. *Adjuvant induced arthritis* telah dilaporkan sebagai model eksperimen dalam mengembangkan studi *arthritis rheumatoid*. Induksi *Complete Freud's Adjuvant* (CFA) menyebabkan respons inflamasi. Manifestasi klinik dan karakteristik gambaran histopatologik analog dengan *arthritis rheumatoid* pada manusia. Untuk itu AIA diterima secara luas sebagai model eksperimen pada hewan coba.¹⁻⁴

Nitrit oksida merupakan mediator inflamasi penting pada patologi *adjuvant induced arthritis*. Kadar NO yang tinggi diduga berkontribusi pada kerusakan substansi jaringan dan sendi secara langsung dan melalui mekanisme

radikal bebas. Reaksi antara nitrit oksida dengan oksigen membentuk spesies peroksinitrit atau dengan hidroksil membentuk radikal hidrogen. Nitrit oksida meningkatkan stres oksidatif dan menyebabkan mutasi DNA yang ikut bertanggungjawab terhadap invasi panus pada sinovium sendi, destruksi kartilago dan tulang serta deformitas.⁵⁻⁹

Saat ini pengobatan konvensional dan farmakologik antiinflamasi NSAIDs seperti *Aspirin* telah digunakan untuk mengatasi dan mengurangi inflamasi serta menghambat perkembangan penyakit *Arthritis Rheumatoid* (AR). Namun seiring sejalan dengan penggunaan NSAIDs, efek samping dari obat tersebut secara kronik dapat menimbulkan gangguan-gangguan pada sistem-sistem tubuh manusia antara lain kerusakan fatal pada organ hati. Disamping itu, harganya pun relatif diperhitungkan bagi masyarakat kalangan bawah dan juga kesulitan untuk mendapatkan bagi mereka yang tinggal diperdesaan.¹⁰

Studi *in vivo* dan *in vitro* pada hewan coba ataupun manusia membuktikan tanaman yang mengandung fitonutrien sebagai anti inflamasi dan anti *arthritis rheumatoid* serta mampu menghambat perkembangan penyakit seperti quercetin, vitamin E, vitamin C, selenium, copper, *zinc*, omega-3, asam gamma linoleid, asam lemak esensial, kolagen, likopen dan flavonid yang terdapat pada jahe, kunyit, advokad, minyak ikan, teh hijau, *boswellia* (*boswellia acid*), *cat's claw* (mengandung glikosid) dan *Triperygium Polyglikosida*.¹¹⁻²⁴

Jambu biji (*Psidium Guajava L*) dipilih dalam penelitian ini karena mengandung senyawa fitonutrien sebagai antioksidan dan antiinflamasi serta bahannya mudah diperoleh dan telah dikenal luas masyarakat. Penelitian terdahulu melaporkan konsumsi 250 gram/hari jambu biji (*Psidium Guajava L*) mampu memperbaiki profil lipid dan meningkatkan serum vitamin C dan vitamin E pada pemuda sehat. Penelitian lain melaporkan pemberian 2 gram/hari jus jambu biji dapat menghambat peroksidasi lipid dan meningkatkan ketahanan membran eritrosit tikus *Diabetes mellitus* lebih baik dibandingkan dosis 0,5 gram/hari dan 1 gram/hari.²⁵⁻²⁷

Jambu biji (*Psidium Guajava L*) mengandung senyawa vitamin C, β -karoten, vitamin E, selenium, copper, zinc, likopen, lutein (astaxantin), xantin, *ellagic acid*, *anthozyanidin*, quercetin, lignin yang memiliki potensi anti inflamasi dan antioksidan.²⁸

Untuk melengkapi peran jambu biji pada bidang medis, penelitian ini mengkaji pengaruh pemberian jus jambu biji (*Psidium Guajava L*) terhadap kadar ion nitrit serum dan gambaran histopatologik panus pada sendi *adjuvant induced arthritis* tikus *wistar*. Dilakukan uji coba menggunakan 1 gram, 2 gram dan 3 gram jus jambu biji karena belum ada dosis pasti yang digunakan, khususnya pada *arthritis rheumatoid*.

1.1.2. Perumusan masalah

Berdasarkan uraian diatas di dirumuskan suatu masalah:

Adakah pengaruh pemberian jus jambu biji (*Psidium Guajava L*) terhadap kadar ion nitrit dan gambaran histopatologik panus pada sendi *adjuvant induced arthritis* tikus wistar ?

1.1.3. Keaslian Penelitian

Saya menyatakan bahwa penyusunan tesis ini didasarkan pada hasil penelitian pada tabel 1 dan tidak menggunakan hasil penelitian pihak lain kecuali yang terdapat pada proposal ini.

Tabel 1. Penelitian yang digunakan sebagai dasar penyusunan proposal penelitian tesis

NO.	Peneliti	Judul	Publikasi	Metode, parameter dan analisis
1	Yongxi u ³	<i>Effect of oral administration of type collagen on adjuvant arthritis in rat and it's mechanism and compare the effect with those of Chinese traditional medicine Trypterygium Polyglycosida and administra</i>	<i>Korean journal Dept of immunology Capital University of Medical Sciences 2006</i>	<p>Metode : Induksi CFA 0,05 ml pada kaki kiri belakang secara intradermal pada tikus jantan strain SD (Sprague-Dawley). Kelompok A mendapat 100 mg/kg ekstrak sternal kartilago ayam, kelompok B :10 mg <i>Trypterygium Polyglycosida</i> kelompok C: 0,1 mol/ml Asam asetat (kontrol)</p> <p>Parameter : Derajat bengkak, histologik sendi dihubungkan indeks imunologi</p>

		<p><i>tion</i> <i>simillary</i></p>	<p>seperti : reaksi delayed type hipersensitif, antikolagen, serum antibody, anti Mycobacterium tuberculosis, kadar IFN-α dan TNF-α.</p> <p>Analisis : Terdapat efek terapi pada tikus dengan arthritis adjuvant: perbaikan mekanisme terkait IFN-α dan TNF-α serta menekan sel imun</p>
2	MasaharuT, et al ²⁰	<p><i>Efect of Alendronate and Prednisolone on a Model of Rheumatoid Arthritis in Mice</i></p>	<p><i>Journal Toxicol Pathol. Japan 2007</i></p> <p>Metode : Mencit betina BALB/C diinduksi dengan antibodi-anti-tipe II kolagen dan LPS intravena</p> <p>Parameter : Ketebalan kaki, skor artritik (oedema dan erytema), histologik kaki, analisis femur menggunakan micro-CT scan. Kelompok dengan Alendronate, kelompok Prednisolon dan kontrol</p> <p>Analisis: Alendronate dan Prednisolon</p>

				<p>menghambat penurunan berat badan, tetapi tidak menghambat artritik dan bengkakan sendi. Prednisolon menghambat destruksi tulang tetapi tidak menghambat oedem, proliferasi synovial dan infiltrasi sel</p>
3	Sulistina Prabowo ⁴	Pengaruh stresor dingin terhadap peradangan <i>arthritis</i> ajuvan	Tesis Universitas Erlangga, 2005	<p>Metode : Tikus wistar jantan diinjeksi dengan CFA 0,1 ml secara intradermal pada ekor masa laten 14 hari, diinjeksi kembali dengan CFA 0,1 ml pada kaki kanan masa laten 7 hari. Tikus diberi vitamin C</p> <p>Parameter : Keradangan pada kaki</p> <p>Analisis : Vitamin C mengurangi peradangan oleh stresor dingin</p>
4	Fletcher, DS, et al ⁵	<i>Therapeutic Administration of a selective Inhibitor of Nitric Oxide synthase Does Not Ameliorate The</i>	<i>Dept of Pharm. And Medical Chemistry, Merck & Co Rahway. New Jersey, 227</i>	<p>Metode : Tikus betina strain Lewis diinjeksi dengan suspensi <i>Mycobacterium butiricum</i> 5 mg/ml pada dorsum kaki</p> <p>Parameter : Volume kaki, karakteristik arthritis (volume</p>

		<p><i>Chronic Inflammation and Tissue Damage With Adjuvant in Induced arthritis Rats</i></p>	<p>jaringan sendi, erosi pada subkondrial, reaksi periostel osteolisis, subluxation dan sendi) NO plasma dan aktivitas enzyme i.NOS</p> <p>Analisis : Ekspreksi i.NOS meningkat pada <i>adjuvant arthritis</i>. Terjadi perubahan berat badan, volume kaki, involusi <i>thymus</i> dan limfa dan kerusakan jaringan</p> <p>Terdapat efek menurunnya NO plasma dengan L-NIL 60 mg/hari selama 14 hari dibandingkan kontrol.</p>
5	Asmah R, Moch FAB dan Zarida H ²⁶	<p><i>The effects of guava (Psidium Guajava L) consumption on total antioxidant and lipid profile in normal male youth</i></p>	<p><i>African J of Food Agriculture Nutrition and development, 2006</i></p> <p>Metode : Mahasiswa usia 18-24 tahun sebanyak 28 orang, menggunakan desain eksperimen. Tahapan penelitian dibagi 3 yaitu (1) <i>Base line</i> 1 minggu, (2) Pengobatan 4 minggu dan (3) Kontrol 4 minggu</p> <p>Parameter : Glukosa plasma, total kolesterol serum, gliserida serum, HDL-kolesterol serum,</p>

				status antioksidan serum, <i>glutation</i> peroksidase, darah, <i>glutation reduktase</i> serum
				Analisis : Konsumsi jambu biji meningkatkan total antioksidan, kolesterol HDL secara signifikan dan menurunkan stres oksidatif
6	Fonnie H ²⁶	Efek jus jambu (<i>Psidium Guajava L</i>)	Tesis Universit as Brawijaya , 2007	<p>Metode : Tikus strain wistar diinjeksi dengan <i>Streptozotocin</i> (STZ) dosis 20 µl/BB/tikus/ hari selama 5 hari secara ip. Kelompok dibagi menjadi 5 yaitu : A = tikus normal, B = tikus DM tanpa terapi, C = tikus DM terapi jus jambu 0,5 gr/hari, D = tikus DM terapi jus jambu 1 gr/hari dan terapi jus jambu 2 gr/hari</p> <p>Parameter: Peroksidasi lipid (kadar MDA) dan ketahanan membran eritrosit (% hemolisis dan eritrosit normal)</p> <p>Analisis : Terdapat pengaruh bermakna pemberian jus jambu biji</p>

(*Psidium Guajava*
L) dosis 2 gram
perhari terhadap
perlakuan lain

Berdasarkan hasil penelitian pada tabel 1 menggambarkan *adjuvant induced arthritis* merupakan model eksperimen yang dikembangkan untuk studi *arthritis rheumatoid*. Fitonutrien yang terdapat pada tanaman telah digunakan sebagai anti-*arthritis*. Jambu biji telah dibuktikan dapat meningkatkan status antioksidan, penghambat peroksidasi lipid dan meningkatkan ketahanan eritrosit.

1.1.4. Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan pertimbangan dalam kajian ilmiah tentang manfaat jambu biji (*Psidium Guajava L*) pada bidang medis.
2. Karena penelitian ini dilakukan pada hewan coba, hasil penelitian diharapkan dapat dikembangkan sebagai dasar penelitian klinik lebih lanjut.

1.2. Tujuan Penelitian

1.2.1. Tujuan Umum

Menganalisis pengaruh pemberian jus jambu biji (*Psidium Guajava L*) terhadap kadar ion nitrit dan gambaran histopatologik panus sendi *adjuvant induced arthritis* tikus Wistar.

1.2.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian jus jambu biji (*Psidium Guajava L*) terhadap kadar ion nitrit serum *adjuvant induced arthritis* tikus Wistar
2. Menganalisis pengaruh pemberian jus jambu biji (*Psidium Guajava L*) terhadap gambaran histopatologik panus sendi *adjuvant induced arthritis* tikus Wistar

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Arthritis rheumatoid (AR)

2.1.1. Definisi

Arthritis rheumatoid adalah suatu penyakit peradangan kronik yang menyebabkan degenerasi jaringan ikat, peradangan (inflamasi) terjadi secara terus-menerus terutama pada organ sinovium dan menyebar ke struktur sendi di sekitarnya seperti tulang rawan, kapsul fibrosa sendi, legamen dan tendon. Inflamasi ditandai dengan penimbunan sel darah putih, pengaktifan komplemen, fagositosis ekstensif dan pembentukan jaringan granular. Inflamasi kronik menyebabkan hipertropi dan penebalan membran pada sinovium, terjadi hambatan aliran darah dan nekrosis sel dan inflamasi berlanjut. Pembentukan panus terjadi oleh penebalan sinovium yang dilapisi jaringan granular. Penyebaran panus ke sinovium menyebabkan peradangan dan pembentukan jaringan parut memacu kerusakan sendi dan deformitas. Biasanya jaringan ikat yang pertama kali mengalami kerusakan adalah jaringan ikat yang membentuk lapisan sendi, yaitu membrane sinovium.²⁶

2.1.2. Epidemiologi

Arthritis rheumatoid masih menjadi masalah kesehatan dunia, diperkirakan 0,5-1 % dari populasi global menderita AR. Peluang terjadinya penyakit hati pada penderita AR dua kali lebih besar dari yang tidak menderita. *America Arthritis Fondation* melaporkan, penderita AR berisiko dua kali lebih besar terkena penyakit jantung sehingga meningkatkan angka kematian penderita *Cardiovascular* dan infeksi. Dilaporkan 50 % pasien AR mengalami kecacatan fungsional sementara setelah 20 tahun, 80 % cacat dan dapat mengurangi usia harapan hidup 3-18 tahun. NHIS melaporkan 8,3 % (17,4 juta orang) di Amerika mengalami keterbatasan beraktivitas akibat arthritis, 2-3 kali lebih tinggi pada wanita dan dapat terjadi pada semua usia.²⁹

Studi epidemiologi melaporkan berbagai faktor risiko yang dihubungkan dengan terjadinya penyakit AR seperti (1) faktor kerentanan terhadap penyakit dan (2) faktor inisiasi yaitu faktor yang diduga meningkatkan risiko berkembangnya penyakit.³⁰

Faktor kerentanan seperti :

- Seks : Biasanya banyak pada wanita (70% dari kasus di *AS, American Arthritis Fondation*), atau pada wanita 3 kali berisiko dari pria.
- Usia : Dapat terjadi pada usia muda 30-50 tahun, usia

lanjut terutama pada wanita kasus AR meningkat.

- **Obesitas** : Memacu meningkatnya oksidan melalui berbagai mekanisme.
- **Sejarah keluarga dan genetik** : Keluarga yang memiliki anggota keluarga terkena AR memiliki risiko lebih tinggi, dan dihubungkan dengan gen HLA-DR4.

Faktor inisiasi adalah :

- **Perokok** : berdasarkan penelitian epidemiologi perokok berisiko tinggi menderita AR.
- **Infeksi** : infeksi bakteri atau virus menjadi inisiasi dari AR.
- **Pil kontrasepsi** :
- *Lifestyle* : stres dan diet mengawali inflamasi sendi.

2.1.3. Fisiologi dan Anatomi

Secara anatomi sendi berada pada pertemuan tulang yang memberikan sifat mudah bergerak. Struktur sendi terdiri dari hialin katilago yang menutupi kapsul. Bagian terluar kapsul terdiri dari fibrous suatu jaringan lunak, periosteum dan bagian dalam terdapat lapisan sinovial. Sinovial adalah suatu kapsul, yang menutup ligamen dan tulang. Pada lapisan luar kapsul membentuk membran *fibrous* dan di sisi kapsul terdapat membran sinovium yang tipis terisi oleh cairan yang mengisi kapsul dan berfungsi sebagai lubrikasi pada ujung tulang

yang menutup kapsul dan melenturkan kartilago. Kartilago dan cairan sinovial memberi sifat mampu bergerak pada sendi. Pada membran sinovial AR mengandung sel serupa fibroblas (sinoviosit, tipe sel B) dan makrofag. Sinoviosit bersifat imunoreaktif, disekresi oleh kolagen dan proteoglikan termasuk ekspresi *vascular sel adhesi molekul 1 (VCAM-1)* dan antigen.³⁹

2.1.4. Patofisiologi

Pada AR, peradangan berlangsung terus menerus dan menyebar kestruktur-struktur sendi di sekitarnya termasuk tulang rawan sendi dan kapsul fibrosa sendi. Akhirnya, ligamentum dan tendon ikut meradang. Peradangan ditandai oleh penimbunan sel darah putih, pengaktifan komplemen, fagositosis ekstensif dan pembentukan jaringan parut. Pada peradangan kronik, membrane sinovium mengalami hipertrofi dan menebal sehingga terjadi hambatan aliran darah yang menyebabkan nekrosis sel dan respons peradangan berlanjut. Sinovium yang menebal kemudian dilapisi oleh jaringan granular yang disebut panus. Panus dapat menyebar ke seluruh sendi sehingga semakin merangsang peradangan dan pembentukan jaringan parut. Proses ini secara lambat merusak sendi dan menimbulkan nyeri hebat serta deformitas.

2.1.5. Etiologi

Arthritis rheumatoid merupakan penyakit autoimun kompleks, yang menyebabkan terjadinya gangguan fungsi normal sistem imun. Penyebab pasti dari kerusakan sistem imun belum dapat dijelaskan. Berbagai studi yang telah dilakukan belum dapat menjawab etiologi penyakit autoimun termasuk AR.¹

Penyakit autoimun termasuk AR dihubungkan dengan berbagai faktor seperti infeksi virus, bakteri, kemiripan molekuler (sel antigen), pembentukan oksidan yang berlebih oleh hormon, usia, obes dan obat yang diduga menyebabkan kegagalan autoregulasi aktivitas sel B dan sel limfosit T. *Break-down* sistem imun diduga dapat terjadi oleh kepekaan genetik (haplotipe HLA tertentu meningkatkan risiko penyakit yang dikaitkan dengan pembentukan autoantibodi tertentu, anti ds-DNA dan antifosfolipid).²

2.1.6. Patogenesis

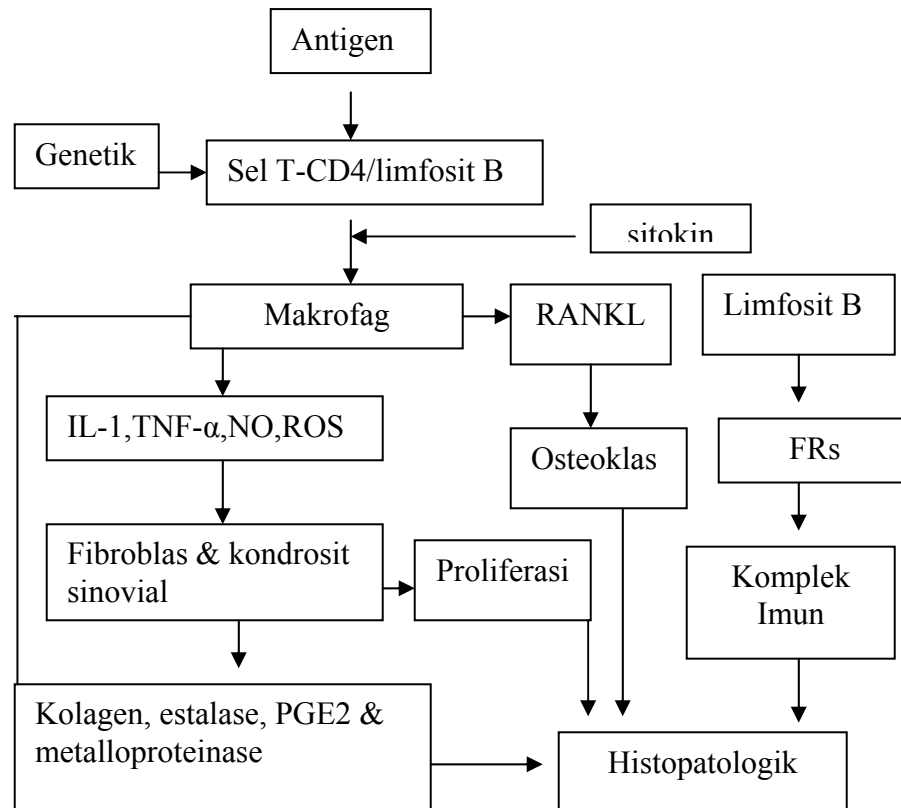
Arthritis rheumatoid adalah penyakit peradangan kronik yang menyebabkan degenerasi jaringan ikat. Peradangan (inflamasi) pada AR terjadi secara terus-menerus terutama pada organ sinovium dan menyebar ke struktur sendi di sekitarnya seperti tulang rawan, kapsul fibrosa sendi, legamen dan tendon. Inflamasi ditandai dengan penimbunan sel darah putih, pengaktifan komplemen, fagositosis

ekstensif dan pembentukan jaringan granular. Inflamasi kronik menyebabkan hipertropi dan penebalan pada membran sinovium, terjadi hambatan aliran darah dan nekrosis sel dan inflamasi berlanjut. Pembentukan panus terjadi oleh penebalan sinovium yang dilapisi jaringan granular. Penyebaran panus ke sinovium menyebabkan peradangan dan pembentukan jaringan parut memacu kerusakan sendi dan deformitas.

AR timbul setelah aktivasi antigen yang memunculkan respons imun. Antigen dapat berupa bakteri, mikoplasma dan virus. Pada bagan 1 menggambarkan bahwa antigen memacu perubahan respons imun non-spesifik dan spesifik berbagai tipe sel termasuk sel T, makrofag, *antigen presenting cell* (APC) dan sel endotel, menyebabkan inflamasi.²

Inflamasi menyebabkan pelepasan berbagai protein sitokin. Sitolin memiliki fungsi antara lain memelihara keseimbangan tubuh selama terjadi respon imun, infeksi, kerusakan, perbaikan jaringan, membersihkan jaringan mati, darah yang membeku dan proses penyembuhan. Jika produksi sitokin meningkat, kelebihan sitokin dapat menyebabkan kerusakan yang serius pada sendi saat inflamasi AR. Sitolin yang berperan penting pada AR antara lain adalah IL-1, IL-6, TNF- α dan NO. Nitrit oksida, diketahui dapat menyebabkan kerusakan sendi dan berbagai manifestasi sistemik.²⁵

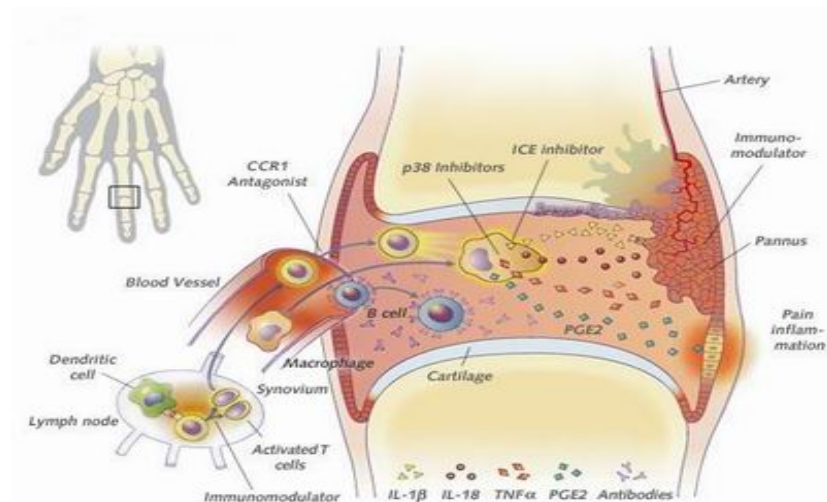
Leukosit adalah bagian sistem imun tubuh yang secara normal dibawa ke sinovium dan menyebabkan reaksi inflamasi atau sinoviositis saat antigen berkenalan dengan sistem imun. Elemen-elemen sistem imun (gambar 1) dibawa ke tempat antigen, melalui peningkatan suplai darah (hiperemi) dan permeabilitas kapiler endotel, sehingga aliran darah yang menuju ke lokasi antigen lebih banyak membawa makrofag dan sel imun lain.²⁶



Bagan 1. Patogenesis AR²⁵

Saat inflamasi leukosit berfungsi menstimulasi produksi molekul yang memiliki peran kunci seperti leukotriens, prostaglandin (membuka pembuluh darah dan meningkatkan aliran darah) dan NO (gas yang berperan dalam fleksibilitas dan dilatasi pembuluh darah, dalam jumlah yang tinggi merupakan substansi yang berperan besar pada berbagai kerusakan AR).³³

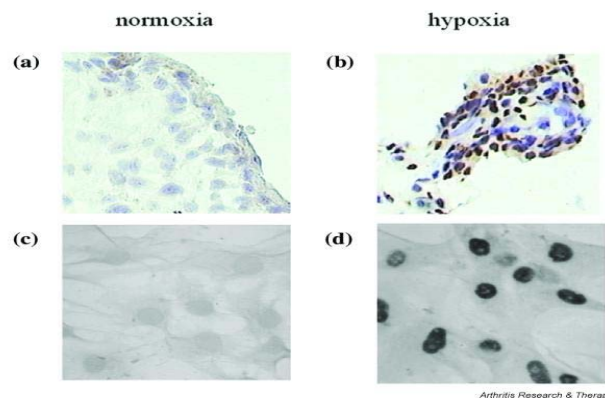
Peningkatan permeabilitas vaskular lokal menyebabkan anafilatoksin (C3, C5). *Local vascular* pada endotel melepas NO dengan vasodilatasi, meningkatkan permeabilitas vaskular, ekspresi molekul adhesi pada endothel, pembuluh darah, ekspresi molekul MHC kelas II dan infiltrasi sel neutrofil dan makrofag.²⁸



(Sumber: [www.http://arthritisresearch&therapy.2007](http://arthritisresearch&therapy.2007))

Gambar 1. Mekanisme inflamasi yang terlibat dalam proses AR²⁶

Inflamasi sinovial dapat terjadi pada pembuluh darah, yang menyebabkan hiperplasia sel endotel pembuluh darah kecil, fibrin, platelet dan inflamasi sel yang dapat menurunkan aktivitas vaskuler pada jaringan sinovial. Hal ini menyebabkan gangguan sirkulasi darah dan berakibat pada peningkatan metabolisme yang memacu terjadinya hipertropi (bengkak) dan hiperplasia (membesar) dan sel dalam keadaan hipoksia (gambar 2). Sel yang hipoksia dalam sinovium berkembang menjadi edema dan menyebabkan multiplikasi sel sinovial. Sel pada sinovium tumbuh dan membelah secara abnormal, membuat lapisan sinovium menebal, sehingga sendi membesar dan bengkak.³⁵



(Sumber: [www.http://arthritisresearchandtherapy.com](http://arthritisresearchandtherapy.com), 2007)

Gambar 2. Perbandingan sel normal dan kondisi hipoksia²⁶

Berkembangnya fase penyakit, ditunjukkan dengan penebalan sinovial membentuk jaringan yang disebut panus. Panus adalah lembaran/lapisan yang menebal membentuk granulasi. Panus dapat

menyebar ke dalam sinovium sendi dan bersifat destruktif terhadap elemen sendi.⁷

Interaksi antara antibodi dan antigen menyebabkan perubahan komposisi cairan sinovial, cairan sinovial kurang mampu mempertahankan fungsi normal dan bersifat agresif-destruktif. Respons dari perubahan dalam sinovium dan cairan sinovial, menyebabkan kerusakan sejumlah besar sendi dan jaringan lunak secara bertahap berdasarkan fase perkembangan penyakit (tabel 2).³⁵

Tabel 2. Fase Perkembangan AR²⁹

Fase	Kejadian	Sel yang terlibat	Manifestasi Klinik
Awal	Kehadiran antigen	Makrofag/ sel dendritik	Tidak ada
	Respons imun	Sel-T	Kaku, bengkak kemerahan
Saat inflamasi	Akumulasi dalam Sinovium	Sel-T/B	
	Produksi interferon IL-1 dan TNF- α	Sel-T	
	Molekul adhesi	Monosit/Makrofag	
	Migrasi transdermal	Sel endothel	
	Aktivasi sel	Sel-T	
		Sinoviocyt (synovial lining cell)	
Degradasi irreversible	Pelepasan molekul	Sinoviocyt	
	Pembentukan panus	Sinoviocyt	Destruksi tulang dan kartilago
	Destruksi	Sinoviocyt	

Destruksi yang terjadi pada tulang menyebabkan kelemahan tendon dan ligamen, perubahan struktur tulang dan deformitas sendi sehingga

mempengaruhi aktivitas harian dan menghilangkan fungsi normal sendi. Destruksi dapat terjadi oleh serangan panus (proliferasi sel pada lining sinovial) ke subkondral tulang. Destruksi tulang menyebabkan area hialin kartilago dan *lining synovial* tidak dapat menutupi tulang, sendi dan jaringan lunak.³⁴⁻³⁵

Pada tahap lebih lanjut, terjadi kehilangan struktur artikular kartilago dan menghasilkan instabilitas terhadap fungsi penekanan sendi, menyebabkan aktivitas otot tertekan oleh destruksi tulang, lebih jauh menyebabkan perubahan struktur dan fungsi sendi yang bersifat ireversibel dan dapat terjadi perubahan degeneratif terutama pada densitas sendi. Destruksi dapat menyebabkan terbatasnya pergerakan sendi secara signifikan, ditandai dengan ketidak stabilan sendi.³⁴⁻³⁵

Kerusakan kartilago pada AR dipacu oleh proses³¹ :

2.1.6.1. Sel Th-CD4 dan sel lain dalam cairan sinovial, aktif mendorong pelepasan sitokin dan aktivitas sel limfosit B.

2.1.6.2. Menarik dan menyimpan sel infiltrasi pada sendi *sublining region*.

2.1.6.3. Terjadi endapan kompleks imun dan produk inflamasi seperti radikal bebas (NO), dan sitokin lain.

2.1.6.4. *Angiogenesis*, perubahan pembuluh darah pada sinovial. Peran angiogenesis pada AR terkait dengan produksi integrin $\alpha v \beta 3$ pada perkembangan sinovial.

Penghancuran matriks dan kartilago diperantarai oleh invasi seluler (panus) kedalam sinovium yang difasilitasi oleh stres oksidatif, merubah mekanisme *repair DNA* yang menyebabkan mutasi pada gen kunci.³²

2.1.7. Manifestasi Klinik

Ahli rheumatologi menjelaskan karakteristik dari AR adalah munculnya gambaran tertentu pada sendi kecil seperti jari tangan dan kaki kaku pada pagi hari dan ada yang kondisinya memburuk sepanjang hari; disertai dengan gejala lain seperti menghilangnya nafsu makan, lesu, demam, anemi dan bengkak pada jaringan di bawah kulit (nodul rheumatoid); bengkak dan nyeri pada sendi jari kaki, tangan, pergelangan, siku dan lutut. Pada fase lanjut terjadi hancurnya jaringan artikular dan deformitas. Pada kondisi yang lebih berat dapat menyerang mata, paru atau pembuluh darah.³²

Arthritis rheumatoid memiliki ciri khusus seperti adanya nodul-nodul *rheumatoid*, konsentrasi RFs yang abnormal dan perubahan radiografi yang meliputi erosi tulang. Penanda *arthritis* saat ini adalah mengukur faktor rheumatoid dikombinasikan dengan pengukuran *anti-cyclic citrullinated antibody (IgG)* atau anti-ccp IgG. Anti-ccp IgG timbul diawal penyakit sebelum nampak gejala klinik dan dapat digunakan untuk membedakan AR dengan tipe arthritis yang lain. Individu dengan nilai anti-ccp IgG positif umumnya diperkirakan

mengalami kerusakan radiologis yang lebih buruk bila dibandingkan dengan individu yang memiliki nilai pengukuran anti-ccp IgG negatif.³⁶

2. 2. *Adjuvant induced arthritis (AIA)*

Salah satu CFA yang sering digunakan yaitu *Adjuvant induced arthritis* (AIA) merupakan model eksperimen AR. Model eksperimen yang pertamakali dikenalkan oleh *Pearson* pada tahun 1956, dengan menginduksi arthritis menggunakan injeksi tunggal *heat-killed Mycobacterium tuberculosis* secara intradermal. CFA memacu inflamasi dan menghasilkan gambaran histopatologik yang analog dengan AR pada manusia. *Complete Freud's adjuvant* mengandung bakteri *heat-killed Mycobacterium Tuberculosis* yang disuspensikan dalam minyak mineral. Dilaporkan berbagai jenis bakteri yang telah dicobakan memiliki respons sama ketika diinjeksi pada spesies yang sama. Inflamasi kronik terjadi setelah hari ke 10-14 pasca imunisasi.⁴⁻⁵

Imunisasi CFA, diduga menyebabkan gangguan respons autoimun dan inflamasi kronik-sistemik. Mekanisme patologi AIA dengan molekuler imitasi, menghasilkan *cross-reactive* pada epitop MT dan CO. Spesifik MT dan CO merupakan *clone* sel T yang aktif setelah imunisasi CFA. Respons autoimun anti MT dan CO meningkat pada tikus yang diimunisasi dan tidak ditemukan pada tikus yang non-imunisasi, dan dihasilkan infeksi yang mirip AR.²³

Pada *adjuvant induced arthritis* menunjukkan ketidak seimbangan sekresi sitokin. Ekspresi sitokin Th2 seperti IL-4 dan IL-10 menurun, tetapi Th1 seperti IFN- α meningkat. Diduga Interferon (IFN)- α memacu makrofag pada lokal infeksi dan melepaskan sitokin inflamasi seperti IL-1 dan TNF- α . Tumor nekrosis factor (TNF)- α memacu infiltrasi sel inflamasi, hiperplasia sinovium dan invasi panus. Kadar IFN- α dan TNF- α dalam artikuler AIA lebih tinggi dari tikus normal dan dihubungkan dengan inflamasi.²⁴

Inflamasi pada AIA tergantung produksi NO₂⁻ yang diduga menentukan perkembangan penyakit. Produksi NO₂⁻ dipacu oleh NOS yang diperantarai i.NOS dari sel endotel dan makrofag saat fagositosis. Ekspresi NOS menyebabkan stres oksidatif. Konsentrasi NO₂⁻ yang tinggi menyebabkan deaminasi deoksinukleotida dan menyebabkan mutasi gen somatik, dapat terjadi pada gen P53. Gen P53 berfungsi pada perbaikan mutasi dan berpengaruh pada pengaturan pertumbuhan sel, mekanisme repair dan apoptosis. Perubahan histologik sendi dihubungkan dengan peningkatan aktivitas NO₂⁻.⁵

Aktivitas NO₂⁻ yang berlebih pada AIA memacu kerusakan sel dan jaringan yang dihubungkan dengan stres oksidatif dan inflamasi. Stres oksidatif pada AIA diduga dipacu oleh peningkatan radikal bebas seperti peroksinitrit dan hidroksil yang terbentuk dari reaksi antara NO₂⁻ dengan O₂⁻ dan OH⁻. Dilaporkan kedua radikal ini bersifat sangat merusak dan

ditemukan pada cairan sinovial. Radikal oksigen dan RNS merusak elemen kartilago dan komponen ekstraseluler seperti respon faktor pertumbuhan kondrosit, meningkatkan apoptosis kondrosit, menghambat sintesis komponen matriks (proteoglikan, kondrosit, kolagen tipe II glikosaminoglikan baru dan metaloprotein) dan merusak DNA (basa DNA dan mekanisme repair DNA).⁵

Karakteristik klinik AIA berupa edema pada berbagai sendi, hiperemi membran sinovial dan pembengkakan daerah pada interpalangeal sendi tikus. Karakteristik klinik tidak hanya terbatas pada sendi, juga dapat terjadi pada ekstra-artikular seperti tendonitis, iritis, lesi nodular dalam organ *visceral*, uretritis dan diare. Faktor rheumatoid (RFs) tidak diproduksi pada AR bentuk eksperimen.^{4,11}

Perubahan derajat pembengkakan pada artikular terjadi oleh proliferasi sel pada sinovial yang berkembang menjadi hiperplasia dan hiperplastis. Hiperplasia pada sinovium dihubungkan dengan fibrosis dan perubahan derajat histologik sendi.²³

Pada tingkat seluler, diduga sitokin seperti IL-1, TNF- α dan sitokin lain termasuk faktor pertumbuhan- β (GF- β), menstimulasi sinoviosit untuk memproduksi enzim yang menyebabkan kartilago terdegradasi. Dalam kondisi normal sitokin berfungsi mengatur produksi dan ekspresi molekul adhesi. Ditemukan CD3 meningkat saat panus menyerang tulang dan kartilago. Beberapa enzim diduga ikut dalam proses pembentukan hiperplastik sinovium

dan panus yaitu matriks *metalloproteinase*, menyebabkan degradasi komponen tulang dan kartilago. Enzim matriks *metalloproteinase* disekresi oleh sinoviosit dan kondroblas saat merespon pelepasan sitokin. Enzim proteolitik yang lain, diduga memiliki peran yang sama.²³

2.3. Ion nitrit

Ion nitrit menggambarkan aktivitas NO_2^- dalam tubuh. Nitrik oksida merupakan tipe radikal oksigen dari RNS. Aktivitas NO_2^- bersifat radikal bebas, membentuk reaksi radikal baru yang berantai yang berpotensi merusak berbagai makromolekul, seperti lipoprotein, protein dan DNA.^{5,6,8,37}

Nitrik oksida merupakan *endothelium-derived relaxing factor* (EDRFs) dibentuk selama metabolisme asam amino L-arginin menjadi sitrulin melalui jalur *L-arginine-nitric-oxide* dengan induksi enzim NO sintase (NOS). Produksi NO_2^- dipacu oleh meningkatnya ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), *endothelial specific nitric oxide synthase* (eNOS) dan *neural specific nitric oxide* (nNOS) oleh berbagai tipe sel seperti sel endotel, sel syaraf, mitokondria dan makrofag. Adanya reseptor spesifik endotel seperti asetilkolin, bradikinin dan serotonin mempengaruhi produksi NO_2^- .³⁸

Nitrik oksida berperan pada fungsi biologi seperti signal sel, prolifersi, apoptosis, proteksi sel, produk radikal bebas, perubahan fisiologi dan patologi

AR. Pada penderita AR ditemukan peningkatan aktivitas NO_2^- , jumlah makrofag, aktivasi neutrofil, HOCL dan elastase. Melalui induksi i.NOS selama proses fagositosis oleh makrofag, NO_2^- berfungsi sebagai bakterisidal. Peningkatan jumlah aktivitas NO_2^- pada AR dihubungkan dengan peningkatan COX dan angiogenesis. Radikal oksigen yang diinduksi oleh O_2 dapat meningkatkan ekspresi i.NOS yang diperantarai oleh makrofag, leukosit *vascular smooth muscle cell*, neuron sehingga meningkatkan produksi NO_2^- .³⁹

Di dalam tubuh NO_2^- bersifat sangat tidak stabil, berbentuk gas dan memiliki *half-life* yang sangat singkat (1-10 sekon) dan segera terdegradasi menjadi ion nitrat dan nitrit yang stabil. Aktivitas nitrit oksida dalam tubuh, dapat diukur menggunakan indikator kadar NO_2^- .³⁷⁻³⁹

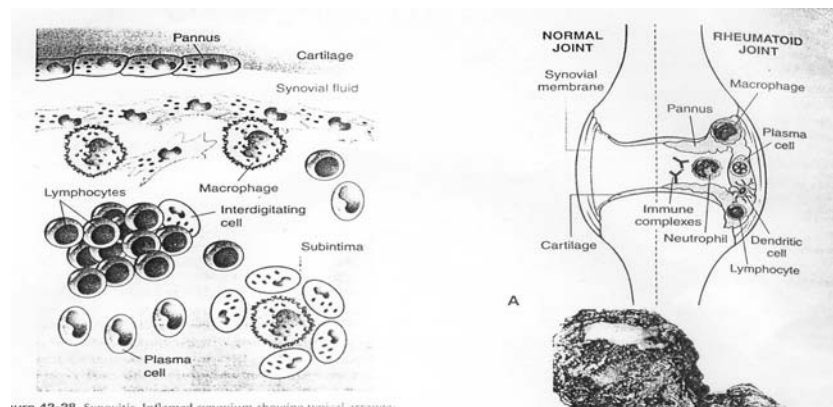
Studi terbaru mengindikasikan sitokin proinflamasi seperti IL-1B dan TNF- α ikut dalam pembentukan toksik peroksinitrit bersama NO_2^- . Ekspresi aktivitas enzim NOS memacu produksi NO_2^- . Produksi IL-6 yang tinggi selama inflamasi ikut berkontribusi meningkatkan risiko AR.⁸⁻⁹

2.4. Gambaran histopatologik

Inflamasi pada AR memacu pelepasan produksi sejumlah mediator inflamasi oleh aktivitas sel sinovial dan makrofag pada fagositosis seperti NO_2^- . Nitrik oksida dapat merusak berbagai molekul seperti protein, lemak, karbohidrat. Inflamasi kronik menyebabkan gangguan poliartikular yang diikuti perubahan pada morfologi dan histologik sendi. Perubahan

histologik pada penderita AR diawali oleh edema pada membran sinovial, neovaskularisasi, hiperplasia serta pertumbuhan fibroblastik yang menjadi dasar terjadinya hiperplasia sinovial. Secara makroskopis menunjukkan adanya pembengkakan sendi. Perubahan volume diikuti pelebaran pembuluh darah dan hiperemi. Pada fase lanjut terjadi perubahan pada artikular kartilago, kapsul fibrous, ligamen, tendon yang dapat menyebabkan deformitas dan kaku sendi.³⁴

Hiperplasia sinovial di tandai dengan proliferasi sel sinovial. Gambaran mikroskopik proliferasi sel, tidak spesifik terdapat sel besar pada sinovial dan fragmen tulang kartilago penderita, sel besar biasanya ditemui pada AR aktif. Inflamasi menyebabkan proliferasi sel dan hiperplasia yang menggambarkan karakteristik klinik dengan fenotip pembengkakan dan pembentukan panus pada bantalan sendi (Cushionfritis). Sel mast dapat menyerang molekul karbohidrat, glikosaminoglikan dalam sendi yang mengakibatkan erosi kartilago, tulang dan ligamen yang dapat menyebabkan *scars*.³⁵



Gambar 3. Infiltrasi sel imun pada proses inflamasi AR³²

Lapisan sinovial pada AR, terbentuk granulasi sel inflamasi secara terus menerus dan menghasilkan epitel berlapis sehingga nampak menebal dan menyebar ke permukaan sendi membentuk panus. Panus merupakan akumulasi sinoviosit dan makrofag, bersama limfosit, sel plasma dan sel mast. Panus merupakan suatu invasi jaringan seluler yang membentuk lembaran dan *vili prominent* pada sinovial menyebabkan efusi tulang dan kartilago *lining* sinovial.³⁴

Destruksi kartilago dan tulang merupakan tahapan akhir AR. Destruksi dapat terjadi oleh serangan panus pada kartilago dan tulang rawan sehingga menyebabkan erosi, kehilangan cairan sinovial dan terbentuk deformitas.³⁵

2.5. Jus jambu biji

2.5.1. T a k s o n o m i

Jus jambu biji adalah jus yang dibuat dari buah jambu biji (*Psidium guajava L*). Jambu biji termasuk famili *myrtaceae*, Genus : *psidium*, spesies : *guajava*. Berbagai nama jambu biji dikenal berdasarkan wilayah seperti : *guava*, *goiaba*, *guayaba*, *djamboe*, *djambu*, *goofier*, *gouyava*, *goyaue*, *goyavier*, *perala*, *gayawas*, *dipajaya jambu*, *petokal*, *tokal*, *guave*, *guavenbaum*, *guayave*, *banjiro*, *goiabeiro*, *guayabo*, *guayaba*, *pichi*, *poshenandi*, *jambu klutuk*, *jambu biji*, *jambu siki*.¹¹

2.5.2. Morfologi

Diperkirakan asal tanaman jambu biji dari Peru, dan saat ini telah tersebar di seluruh dunia. Ada pula jenis jambu biji yang diduga berasal dari Brazilia Amerika Tengah dan menyebar ke Thailan kemudian ke negara Asia termasuk Indonesia.¹¹

Jambu biji termasuk tanaman buah perdu. Jambu biji dapat tumbuh didaerah ketinggian 1.200 m di atas permukaan laut. Tanaman jambu biji memiliki banyak cabang dan ranting dengan tinggi mencapai 12 meter. Daunnya berbentuk bulat telur, kasar dan kusam. Batangnya keras dengan bunga kecil berwarna putih. Buahnya mengandung banyak biji (ada varitas yang tak ada bijinya), berwarna putih, kuning atau merah.¹¹

Diperkirakan dari 150 jenis jambu biji yang dikenal, jenis *Guajava psidium* yang dipercaya mengandung nutrien antioksidan dan memiliki kemampuan terapis dan ditemukan di daerah tropis. Jambu biji yang umum dijumpai di Indonesia adalah jenis lokal dan bangkok yang merupakan hasil persilangan melalui stek atau okulasi dengan jenis yang lain.¹¹

Dari sejumlah varitas jambu biji, ada beberapa varitas yang digemari dan memiliki nilai ekonomi, sehingga banyak yang membudidayaka, diataranya.¹³

2.5.2.1. Varitas sukun (tanpa biji).

2.5.2.2. Jambu Bangkok (buah besar, daging tebal, biji sedikit dan rasa agak hambar).

2.5.2.3. Jambu merah.

2.5.2.4. Jambu pasar minggu.

2.5.2.5. Jambu sari.

2.5.2.6. Jambu apel.

2.5.2.7. Jambu Palembang.

2.5.2.8. Jambu merah getas.

2.5.3. Kandungan Jambu Biji

Tanaman jambu biji mengandung berbagai komponen yang hampir sama menyusun buah, daun batang, akar dan bunganya. Daunnya mengandung tanin, minyak atsiri (zat *avikulanin* dan *guaiferin* yang bersifat anti bakteri), asam ursalat, asam psidiolat, asam krotagolat, asam oleoanolat, asam *guajaverin*, vitamin, garam mineral dan zat samak (*psiditanin*).¹²⁻¹³

Buah jambu biji mengandung komponen vitamin A 792 IU (79 mcg RE), vitamin B1 0,05 mg, vitamin C 183,5 mg, vitamin E 1,12 mg, asam folat 14 mcg, mineral seperti kalsium 20 mg, fosfor 25 mg, besi 0,31 mg, seng 0,23 mg, CU 0,103 mg selenium 0,6 mg (disajikan

dengan lengkap pada lampiran 1), senyawa fenolik seperti likopen, zeaxantin, quercetin.²⁵

Jambu biji memiliki potensi di bidang medis sebagai sumber senyawa antioksidan (vitamin C, vitamin E, β -karoten, seng dan selenium) dan berperan sebagai fitonutrien yang secara ilmiah dibuktikan melalui berbagai studi. Studi pengaruh konsumsi jambu biji terhadap status oksidan dan profil lipid (total kolesterol, trigliserid, LDL-kolesterol dan HDL-kolesterol) pada pemuda sehat, menunjukkan konsumsi jambu biji memperbaiki status oksidan dan profil lipid.¹²⁻¹³

2.6. Hubungan stres oksidatif, antioksidan dan AR.

Secara alami tubuh memiliki sistem protektif untuk menetralkan radikal bebas, melalui suatu sistem antioksidan kompleks. Ketidak seimbangan senyawa oksidan dan antioksidan dapat menyebabkan sistem antioksidan gagal menginaktivkan oksidan, sehingga menghasilkan peningkatan produk oksidan yang dapat menyebabkan stres oksidatif yang dihubungkan dengan awal kondisi patogenesis berbagai penyakit termasuk AR.⁴⁰

2.6.1. Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah kondisi tubuh dimana senyawa radikal bebas melebihi toleransi tubuh. Stres oksidatif terjadi oleh berbagai mekanisme reaksi radikal bebas seperti (a) inisiasi yaitu permulaan

terbentuknya radikal bebas; (b) propagasi terjadinya rangkaian reaksi oleh timbulnya radikal bebas dan (c) terminasi terjadi pemusnahan atau inaktivasi radikal bebas, baik oleh antioksidan endogen, eksogen atau enzim. Kegagalan terminasi dapat terjadi selama mekanisme perbaikan DNA yang menyebabkan mutasi gen. Mutasi gen dikaitkan dengan perubahan struktur DNA dan kerusakan DNA yang dapat terjadi melalui tiga (3) mekanisme berikut.⁴⁰

2.6.1.1. Reaksi peroksidasi pada membrane lipid dan sitosol menyebabkan terjadi reaksi reduksi asam lemak (otokatalisis) yang berakibat kerusakan membran dan organ sel.

2.6.1.2. Modifikasi protein teroksidasi yaitu reaksi silang yang terjadi dari dampak radikal bebas melalui mediator sulfhidril oleh asam amino yang labil seperti sistein, metionin, lisin, histidin dan memecah rantai polipeptida.

2.6.1.3. Kerusakan DNA timbul pada satu pita atau ke-dua pita yang berakibat pada kematian sel.

Radikal bebas adalah senyawa yang mempunyai elektron tanpa pasangan pada orbit terluar, bersifat sangat reaktif dengan waktu paruh yang sangat pendek. Elektron yang dimiliki cenderung pindah atau menarik elektron dari molekul disekitarnya.⁴¹

Radikal bebas yang telah dikenal secara *in vivo* adalah (1) Radikal oksigen (*oksigen-centered*, R-O) seperti *superoksid* (O_2^-), alkoksil ($R-C=O$), peroksid ($R-C-COO-R$), NO , NO_2^- dan OH^- ; (2) Radikal karbon (*carbon-centured*, *carbony*, $R-C-C-R$) dan (3) Radikal sulfur, yang lain adalah Fe^{++} , Fe^{+++} , NO_2^- , NO_3^- , CCl_3 dan Cl^- . Radikal bebas yang tidak stabil akan cepat mengalami dekomposisi spontan seperti *superoksid* (O_2^-). Oksigen mengalami dekomposisi membentuk *superoksid* dan hidrogen peroksid.⁴²

Pada dasarnya radikal bebas di bentuk secara kontinyu oleh jaringan sebagai hasil reaksi metabolit dari suatu mekanisme endogen dan eksogen seperti aktivitas berbagai enzim oksidatif yang terdapat dalam mitokondria, lisosom, sitosol dan membran sel.⁴³

Senyawa radikal bebas dapat bereaksi dengan molekul lain melalui berbagai mekanisme seperti oksidasi, reduksi, abstraksi dan dismutasi. Reaksi senyawa radikal dengan molekul lain dapat mengalami propagasi.⁴⁰⁻⁴³

2.6.2. Antioksidan

Sistem antioksidan tubuh meliputi antioksidan enzim dan non-enzim. Antioksidan enzim seperti SOD, GPx (*gluthation peroksidase*), katalase dan *glukosaoksidase*; semuanya ini inaktif selama makanan diproses. Antioksidan non-enzim seperti vitamin C, vitamin E

(tokoferol), β -karoten, selenium dan seng. Sumber antioksidan dapat diperoleh dari diet berbagai komponen tanaman yang kaya kandungan antioksidan seperti buah dan sayuran yang biasa dimakan dan tanaman lainnya.⁴⁴

Pada AR, peran antioksidan dihubungkan dengan berbagai fungsi sistem imun dan kerusakan oksidatif membran sendi akibat inflamasi. Kerusakan oksidatif yang terjadi disebabkan oleh peningkatan radikal bebas atau oksidan yang pada akhirnya dapat meningkatkan stres oksidatif tubuh. Studi epidemiologi secara luas menjelaskan bahwa faktor diet berpengaruh pada berbagai penyakit kronik, termasuk peran diet pada AR. Konsumsi buah, sayuran dan diet antioksidan berperan sebagai protektif dalam patogenesis penyakit jantung dan kanker, termasuk AR.⁴⁵

Banyak sumber antioksidan alami yang terdapat pada bahan pangan seperti buah dan sayuran dan diketahui berpengaruh terhadap proses oksidasi dalam siklus hidup sel. Antioksidan (mikronutrien) dan enzim intrasel dapat memproteksi kerusakan jaringan oleh oksidan. Untuk ini diperlukan kemampuan antioksidan agar terdistribusi ke jaringan dengan pertimbangan nilai *bioavailability* molekul antioksidan, karena sifat kelarutan antioksidan berbeda-beda. Vitamin E bersifat lipolitik, berbeda kemampuannya dengan antioksidan hidrolitik seperti vitamin C,

memungkinkan efek antioksidan tergantung perbedaan area jaringan.^{47,48}

Studi klinik membuktikan adanya risiko stres oksidatif yang tinggi pada penderita AR. Dilaporkan kadar MDA dan produksi lipid peroksidasi lebih tinggi secara signifikan pada cairan sinovial dan serum penderita dibanding kontrol. Penelitian terpisah melaporkan adanya perubahan kadar antioksidan pada AR yang menyebabkan penurunan aktivitas SOD dan GPX.⁴⁹

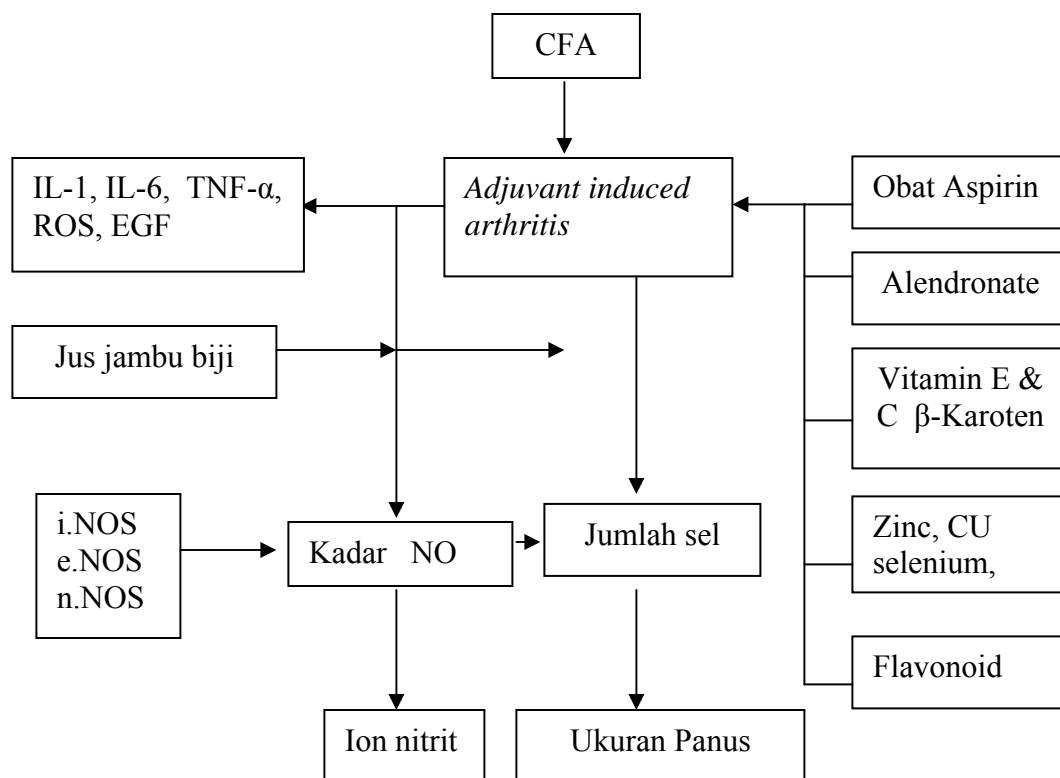
Diet tinggi antioksidan seperti vitamin E, vitamin C, β -karoten dan fenol terbukti dapat mengurangi tanda-tanda penyakit. Penelitian terpisah melaporkan pemberian diet antioksidan memperbaiki status oksidan penderita AR. Ditemukan konsentrasi selenium darah dan komponen GPX lebih rendah pada penderita AR dibandingkan subyek sehat. Pemberian suplementasi selenium mampu meningkatkan aktivitas GPX darah pada penderita. Penderita AR yang diberi makanan olahan sumber antioksidan menghasilkan peningkatan SOD dan aktivitas GPX pada serum penderita. Kombinasi diet standar yang ditambahkan tinggi antioksidan, mampu meningkatkan aktivitas GPX pada serum dan menyebabkan kontrol penyakit lebih baik dan terjadi perbaikan status antioksidan yang dihubungkan dengan berkurangnya tanda-tanda penyakit.⁴⁸

Pemberian vitamin C pada tikus ajuvan arthritis yang distresor dengan suhu dingin mampu mengurangi radang. Vitamin C adalah substansi *scavenger*, mereduksi aktivitas sinergis dua atau lebih antioksidan lain. Pada permukaan ekstrasel, antioksidan yang bermolekul kecil seperti vitamin C, β -karoten dan vitamin E berperan penting sebagai pertahanan. Konsentrasi antioksidan yang bermolekul kecil ini pada plasma ditentukan oleh jumlah diet yang dimakan. Pemberian diet tinggi antioksidan diduga mampu menekan i.NO_s, sehingga aktivitas NO menurun.⁴⁹

BAB 3

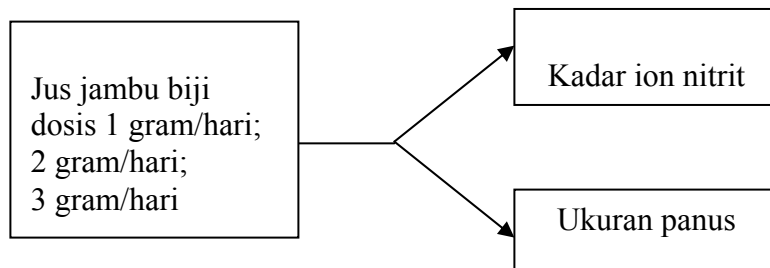
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori



Bagan 2. Hubungan faktor-faktor yang mempengaruhi produksi ion nitrit dan gambaran histopatologik panus

3.2. Kerangka Konsep



Bagan 3. Kerangka konsep penelitian

3.3. Hipotesis

1. Ada pengaruh pemberian jus jambu biji (*Psidium Guajava L*) terhadap kadar ion nitrit serum *adjuvant induced arthritis* tikus Wistar
2. Ada pengaruh pemberian jus jambu biji (*Psidium Guajava L*) terhadap gambaran panus sendi *adjuvant induced arthritis* tikus Wistar

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorik, menggunakan *the post test only control group design*, binatang percobaan digunakan sebagai objek penelitian. Modifikasi rancangan penelitian sebagai berikut :

-	O1
X2	O2
X3	O3
X4	O4
X5	O5

Keterangan:

- : Tanpa terapi
- O1 : Observasi 1 (kontrol negatif: tanpa terapi)
- X2 : Perlakuan 2 (kontrol positif: terapi aspirin 67,5 mg/hari)
- O2 : Observasi 2
- X3 : Perlakuan 3 (jus jambu biji 1 gram/hari)
- O3 : Observasi 3
- X4 : Perlakuan 4 (jus jambu biji 2 gram/hari)
- O4 : Observasi 4
- X5 : Perlakuan 5 (jus jambu biji 3 gram/hari)
- O5 : Observasi 5

4.2. Ruang Lingkup Penelitian

4.2.1. Subyek Penelitian

Populasi : Tikus (*Rattus norwegicus*) galur *wistar* jantan

Sampel : Sampel diperoleh secara random yang memenuhi

kriteria inklusi dan eksklusi

4.2.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian : 60 hari

Tempat penelitian : Laboratorium Biologi dan Biokimia Universitas
Brawijaya Malang (pemeliharaan hewan coba dan
analisa ion nitrit). Laboratorium Patologi Anatomi
Universitas Gajah Mada (pembacaan preparat).

4.3. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.3.1. Kriteria Inklusi

Tikus Wistar jantan

umur 12-14 minggu

Berat badan 120-140 gram

4.3.2. Kriteria eksklusi

Tikus sakit selama adaptasi dan penelitian (gerakan tidak aktif)

Mati selama penelitian berlangsung

4.4. Randomisasi

Tiga puluh ekor tikus dikelompokkan secara random menjadi 5
kelompok yaitu:

K- : 5 tikus

K+ : 5 tikus

X3 : 5 tikus

X4 : 5 tikus

X5 : 5 tikus

4.5. Variabel Penelitian

A. 4.5.1. Variabel Independen

Jus jambu biji dosis 1 gram, 2 gram dan 3 gram

B. 4.5.2. Variabel Dependen

1. Ion nitrit pada serum
2. Gambaran histopatologik panus sendi kaki tikus

4.6. Defisini Operasional

4.6.1. Variabel independen

1. Jus jambu biji adalah jus yang diperoleh dari buah segar dan seduhan air biji jambu, yang diberikan pada kelompok perlakuan X3, X4 dan X5 setiap pagi selama 14 hari dengan dosis 1 gram, 2 gram dan 3 gram per hari.

4.6.2. Variabel dependen

1. Ion nitrit adalah hasil metabolisme NO dalam darah. Darah tikus diperoleh melalui jantung menggunakan spuit sebanyak 3 ml. Analisa ion nitrit menggunakan Kit iNtRON dengan mengukur

diazotisasi (metode Griess) berdasarkan pada perubahan warna.

Pembacaan dengan metode Elisa dan diukur dalam satuan ($\mu\text{mol/l}$).

2. Gambaran histopatologik panus sendi kaki tikus. Panus adalah pertumbuhan jaringan oleh penebalan dan pengentalan cairan sinovial bersama infiltrasi sel imun kedalam sinovium. Gambaran histopatologik panus dinilai setelah dilakukan pewarnaan HE dan dinyatakan dalam skor variabel ukuran panus (kriteria 0 = tidak nampak panus pada sinovial; 1 = panus memenuhi < 25 % dari sinovial; 2 = panus memenuhi 25% - 50% dari sinovial; 3 = panus memenuhi 50% - 100 % dari sinovial, tetapi tidak padat; 4 = panus nampak padat dan memenuhi 50%-100% dari sinovial.

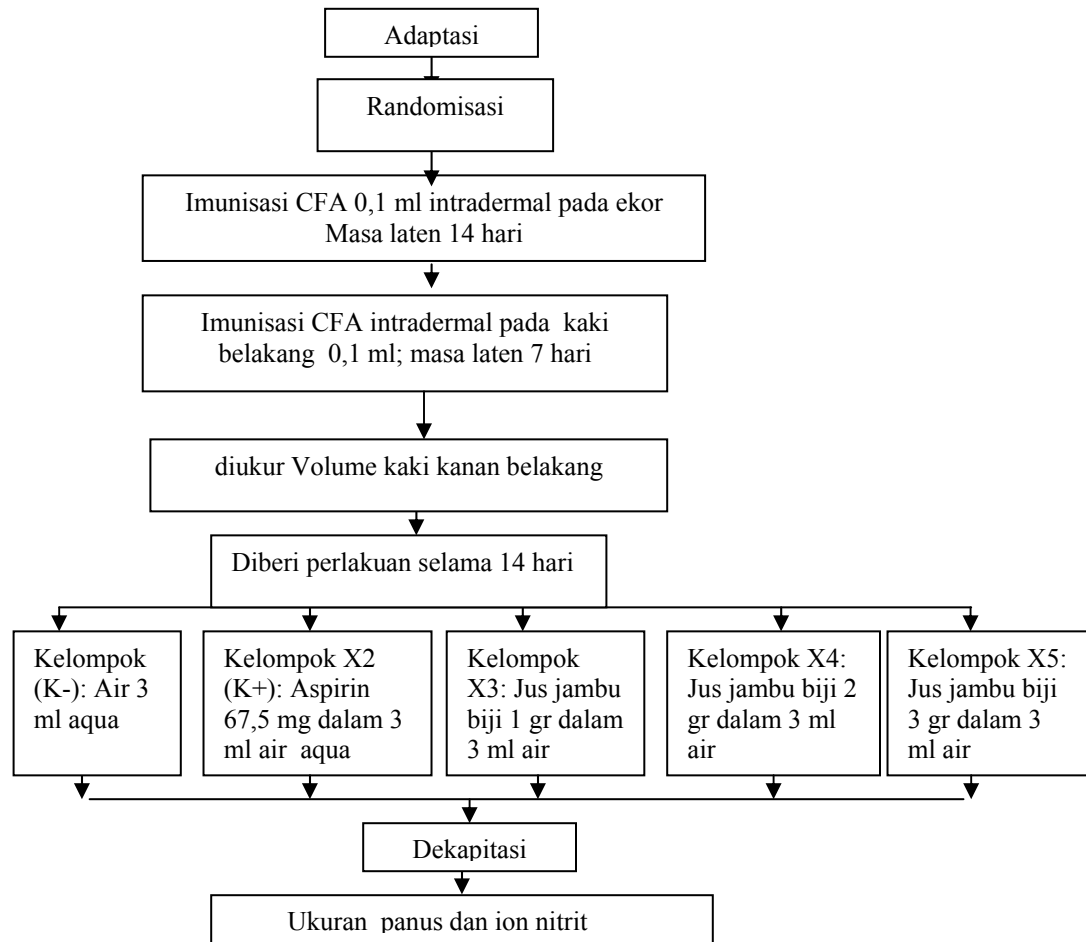
4.6.3. Variabel karakteristik klinik

Volume kaki diukur pada kaki kanan belakang menggunakan *mercury placement plethysmography* menggunakan satuan mlHg.

Alat yang digunakan diperoleh dari laboratorium Farmakologi

Universitas Diponegoro Semarang.

4.7. Kerangka Kerja Penelitian



Bagan 4. Prosedur kerja penelitian

4.8. Bahan dan Materi

- | | | |
|----------------------|----------------------|---------------------|
| - Sampel darah tikus | - Reagent FCA | - Reagen griess KIT |
| - Larutan PFA 10 % | - Larutan NaCL 0.9 % | - Asam nitrat % |
| - larutan Xilol | - Alkohol absolut | - Air aquades |

- Hemaktosilin - Alkohol Asam 0,4% - Eosin
- Lithium Karbonat Jenuh - Kanada balsam

4.9. Alat/Instrumen Penelitian

- | | |
|----------------------|---------------|
| - Blender | - Saringan |
| - Pipet | - Pinset |
| - Kandang hewan coba | - Kit elisa |
| - obyek gelas | - Mikroskop |
| - Tabung reaksi | - Cawan petri |
| - Labu takar | - Beker gelas |

4.10. Prosedur Kerja

4.10.1. Imunisasi CFA

Imunisasi CFA merupakan ajuvan yang mengandung *Heat-Killed Mycobacterium tuberculosis* dalam suspensi minyak mineral, dilakukan pada semua kelompok sampel tikus setelah adaptasi. Dosis yang digunakan untuk injeksi berdasarkan penelitian terdahulu, yaitu injeksi CFA 0,1 ml ekor secara intradermal ditujukan untuk membentuk sel memori selama inflamasi akut, setelah 14 hari kemudian diinjeksi kembali sebanyak 0,1 ml pada kaki belakang kiri dan kanan secara intradermal masa laten 7 hari, hal ini ditujukan untuk meningkatkan respons inflamasi, yang menyebabkan sel T

asesori dan sel B teraktivasi, memacu makrofag melepaskan mediator inflamasi.

4.10.2. Jus jambu biji

Jus jambu biji diperoleh dari jambu biji yang telah matang penuh, ditandai dengan warna kulit menjadi kuning merata dan isi buah berwarna merah. Pengolahan jus perlakuan dilakukan sebagai berikut:

1. Daging buah dari 100 gram jambu biji di blender dengan menghancurkan semua bagian buah termasuk kulit tanpa penambahan air, kemudian disaring untuk memisahkan biji dari daging buah.
2. Biji dan bagian yang melapisi biji (di luar daging buah) direbus sampai mendidih, kemudian disaring.
3. Jus daging buah jambu biji ditimbang 1 gram dan ditambahkan cairan pada nomor 2 sampai volume 3 cc dan digunakan untuk perlakuan kelompok X3 (pemberian jus jambu biji 1 gram)
4. Jus daging buah jambu biji ditimbang 2 gram dan ditambahkan cairan pada nomor 2 sampai volume 3 cc dan digunakan untuk perlakuan kelompok X4 (pemberian jus jambu biji 2 gram)

5. Jus daging buah jambu biji ditimbang 3 gram dan ditambahkan cairan pada nomor 2 sampai volume 3 cc dan digunakan untuk perlakuan kelompok X5 (pemberian jus jambu biji 3 gram)

Ditetapkan dosis 1-3 gram/hari karena belum ada dosis yang pasti. Pertimbangan berikut dijadikan alasan penetapan dosis : 1) 200 gram perhari untuk konsumsi manusia, hasil konversi ke tikus ($200 \times 0,018$ untuk berat tikus 200 gram) adalah 3,2 gram jambu biji/200 gram BB tikus; 2) memperhatikan hasil penelitian sebelumnya bahwa pemberian 2 gram jus jambu biji memberikan hasil terbaik untuk menghambat peroksidasi lipid dan ketahanan eritrosit.

4.10.3. Pemeriksaan Ion Nitrit

Pengukuran ion nitrit sebagai berikut:

Tahap persiapan sampel:

1. Darah yang diperoleh dari tikus diinkubasi pada suhu kamar selama 5 jam, kemudian di sentrifus untuk mendapatkan serum. Sebelum dianalisa, serum disimpan dalam freezer pada -20°C .
2. Serum yang diperoleh dipurifikasi seperti pada lampiran 2.

Tahap pengukuran ion nitrit:

1. Pengukuran ion nitrit adalah: inkubasi selama 10 menit dengan reagent griess I (0,3% sulfanilamide in 2,5 % phosphoric acid)

dan Griess II (0,3% *naphtylenediamin* dalam 2,5 % phosphoric acid) pada suhu ruang.

2. Pengukuran absorbansi larutan menggunakan Elisa Reder.
3. Konsentrasi ion nitrit ditentukan dengan rumus persamaan yang diperoleh dari kurva standar.

4.10.4. Pemeriksaan gambaran histopatologik panus

4.10.4.1. Dekalsifikasi tulang

Dekalsifikasi tulang dilakukan untuk memudahkan pengirisan jaringan. Dekalsifikasi dilakukan dengan merendam tulang dalam asam nitrat 10 % selama 5 hari.

4.10.4.2. Proses jaringan

1. Jaringan sendi dari sampel diambil dan difiksasi dalam buffer formalin 10 % selama 24 jam
2. Jaringan didehidrasi menggunakan larutan aseton $\frac{1}{2}$ jam sebanyak 3 kali
3. Di *clearing* dengan xylol/benzene selama $\frac{1}{4}$ sampai $\frac{1}{2}$ jam
4. Impregnating yaitu jaringan dimasukkan kedalam media berisi parafin cair selama 90 menit

5. Dilakukan *embedding* yaitu dibuat blok parafin
6. Jaringan dipotong dengan mikrotom setebal 4 mikron dan diletakkan dikaca obyek dan ditetesi dengan kanada balsam.
7. Jaringan siap untuk diwarnai

4.10.4.3. Pengecatan Hematoksilin Eusin (HE)

1'. Xilol I	5 menit
2. Xilol II	5 menit
3. Alkohol absolut	2 menit
4. Alkohol absolut	2 menit
5. Alkohol absolut	2 menit
6. Air mengalir	2 menit
7. Hemaktosilin	5 menit
8. Air mengalir	2 menit
9. Alkohol Asam 0,4%	2-3 celup
10. Air mengalir	2 menit
11. Lithium carbonat Jenuh	2-3 celup
12. Air mengalir	2 menit
13. Eosin	1 menit
14. Alkohol absolut	2 menit
15. Alkohol absolut	2 menit

- | | |
|--|---------|
| 16. Alkohol absolut | 2 menit |
| 17. Xilol | 5 menit |
| 18. Xilol | 5 menit |
| 19. Xilol | 5 menit |
| 20. Kanada balsam dan ditutup dengan <i>deck glass</i> | |
| 21. Siap untuk diperiksa dibawah mikroskop | |

4.11. Pengumpulan dan pengolahan data

Data yang dikumpulkan meliputi berat badan, volume kaki belakang tikus sebelum imunisasi, setelah imunisasi dan setelah penelitian; kadar ion nitrit dan gambaran histopatologik (meliputi lapisan sinovial, ukuran panus dan destruksi kartilago dan tulang) setelah perlakuan.

Data terkumpul dilakukan cleaning, editing kemudian entry data dan diolah menggunakan program komputer *SPSS 13.0 for Windows*.

4.12. Analisis data

Analisis data meliputi analisis deskriptif seperti nilai rerata, *standart deviasi* dan grafik. Analisis analitik menggunakan uji beda.

Pada variabel independen pemberian jus 1-3 gram/hari, didapatkan skala pengukuran rasio. Pada variabel dependen untuk kadar ion nitrit didapatkan skala pengukuran rasio dan ukuran panus didapatkan skala pengukuran ordinal. Pada variabel karakteristik klinik yaitu volume kaki belakang didapatkan skala pengukuran rasio.

Data dengan skala rasio (berat badan, volume kaki dan kadar ion nitrit) dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test*. Data berat badan tidak terdistribusi normal sehingga digunakan uji non parametrik. Data volume kaki dan kadar ion nitrit dilakukan transformasi data sebelum digunakan uji beda *One Way Anova*. Hasil pengukuran kadar ion nitrit dilanjutkan dengan uji beda terkecil menggunakan uji *Post Hoc-LSD*. Data pengukuran volume kaki tikus

awal (hari ke-0) dan setelah imunisasi (hari ke-21). Uji *t-paired test* untuk menganalisis perbedaan volume kaki setelah imunisasi dengan CFA dengan setelah perlakuan. Skor gambaran histopatologik panus berskala ordinal untuk itu dipilih uji beda non parametrik menggunakan *Kruskal Wallis tes dan Mann-Whitney*.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1. Karakteristik Sampel

5.1.1. Gambaran Umum Penelitian

Selama penelitian (60 hari) tidak ada tikus yang sakit (tidak aktif) ataupun mati, jumlah tikus awal penelitian sampai akhir penelitian adalah 25 ekor. Umur tikus yang digunakan pada awal penelitian 12 – 14 minggu dengan berat badan awal 120-140 gram. Hasil uji berat badan dengan *Kruskal-Wallis*, menunjukkan tidak ada perbedaan berat badan sampel pada awal penelitian, dengan nilai $p: 0,22 > 0.05$. Pada akhir penelitian (hari ke 35) semua tikus dikorbankan untuk memeriksa ion nitrit serum dan gambaran histopatologik panus sendi.

5.1.2. Pengaruh imunisasi CFA pada *Adjuvant Induced Arthritis* (AIA)

Perubahan ukuran volume kaki setelah imunisasi ditemukan pada semua tikus yang diukur pada hari ke-21. Diketahui terjadi peningkatan volume kaki setelah imunisasi CFA pada semua kelompok perlakuan. Uji deskriptif volume kaki awal penelitian, setelah imunisasi dan setelah perlakuan didapatkan hasil sebagaimana disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji deskriptif volume kaki AIA kelompok perlakuan

Kelompok perlakuan			Statistik	Standard error
Volume kaki dalam ml Hg awal penelitian	Non-terapi (K-)	Mean	0,55	0,01
		Median	0,55	
		Stan.Dev	0,02	
	Aspirin (K+)	Mean	0,58	0,04
		Median	0,57	
		Stan.Dev	0,09	
	Jus jambu biji 1 gram	Mean	0,55	0,02
		Median	0,55	
		Stan.Dev	0,03	
	Jus jambu biji 2 gram	Mean	0,51	0,02
		Median	0,51	
		Stan.Dev	0,04	
	Jus jambu biji 3 gram	Mean	0,52	0,02
		Median	0,53	
		Stan.Dev	0,03	
Volume kaki dalam ml Hg setelah imunisasi	Non-terapi (K-)	Mean	1,45	0,05
		Median	1,40	
		Stan.Dev	0,12	
	Aspirin (K+)	Mean	1,53	0,17
		Median	1,47	
		Stan.Dev	0,37	
	Jus jambu biji 1 gram	Mean	1,44	0,05
		Median	1,41	
		Stan.Dev	0,10	
	Jus jambu biji 2 gram	Mean	1,56	0,09
		Median	1,45	
		Stan.Dev	0,20	
	Jus jambu biji 3 gram	Mean	1,58	0,023
		Median	1,56	
		Stan.Dev	0,05	
Volume kaki dalam ml Hg setelah perlakuan	Non-terapi (K-)	Mean	1,57	0,09
		Median	1,60	
		Stan.Dev	0,19	
	Aspirin (K+)	Mean	1,10	0,10
		Median	1,10	
		Stan.Dev	0,2	
	Jus jambu biji 1 gram	Mean	1,12	0,10
		Median	1,25	
		Stan.Dev	0,22	
	Jus jambu biji 2 gram	Mean	1,09	0,01
		Median	1,10	
		Stan.Dev	0,16	
	Jus jambu biji 3 gram	Mean	1,00	0,08
		Median	1,04	
		Stan.Dev	0,17	

Tabel 3 diatas menggambarkan volume kaki awal penelitian, setelah imunisasi dan setelah perlakuan. Pada awal penelitian *mean* volume kaki yang paling tinggi pada kelompok perlakuan kontrol K+ (0,58 ml Hg) dan yang paling rendah pada kelompok perlakuan jus jambu 2 gram/hari (0,51 ml Hg). Setelah imunisasi *mean* volume kaki yang paling tinggi pada kelompok perlakuan jus jambu biji 3 gram/hari (1,58 ml Hg) dan yang paling rendah adalah kelompok perlakuan jus jambu biji 1 gram/hari (1,44 mlHg). Gambaran perbedaan volume kaki tikus sebelum dan setelah imunisasi disajikan pada gambar 4, yang menunjukkan terjadi pembengkakan pada semua sendi kaki setelah imunisasi CFA (hari ke-21) yang ditandai dengan meningkatnya ukuran volume kaki tikus.



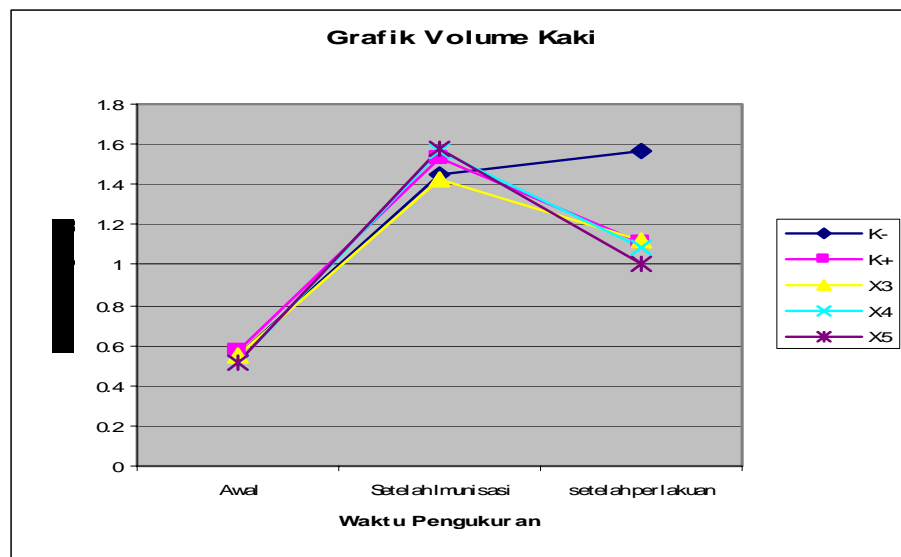
a. Volume kaki hari ke-0



b. Volume kaki hari ke-21

Gambar 4. Foto kaki sampel awal penelitian (hari ke-0) dan setelah imunisasi (hari ke-21)

Setelah perlakuan terjadi penurunan *mean* volume kaki pada kelompok perlakuan K+ (1,10 ml Hg), jus jambu biji 1 gram/hari (1,12 ml Hg), jus jambu biji 2 gram/hari (1,09 ml Hg) dan 3 gram/hari (1,00 ml Hg), tetapi pada kelompok non terapi (K-) menunjukkan *mean* volume kaki meningkat (1,57 ml Hg) dibanding sebelum perlakuan (1,45 ml Hg). *Mean* volume kaki setelah perlakuan yang paling tinggi adalah kelompok kontrol (K-). *Mean* volume kaki pada kelompok perlakuan aspirin (1,10 ml Hg) lebih tinggi dari kelompok jus jambu 2 gram/hari (1,09 ml Hg) dan kelompok jus jambu biji 3 gram/hari (1,00 ml Hg). Gambaran perubahan *mean* volume kaki dengan jelas di sajikan pada grafik 1.



Grafik 1. Perubahan volume kaki AIA pada awal penelitian (hari ke-0), setelah imunisasi (hari ke-21) dan setelah perlakuan (hari ke-35)

Grafik 1 menggambarkan *mean* volume kaki tikus pada awal penelitian berkisar antara 0,4 - 0,6 ml Hg dan setelah imunisasi *mean* volume kaki tikus meningkat pada semua kelompok (1,4–1,6 mlHg), hasil uji *t-paired* menunjukkan ada perbedaan volume kaki sebelum dan setelah imunisasi pada semua kelompok perlakuan dengan p : 0,01. Setelah perlakuan gambaran volume kaki pada kelompok perlakuan antara 1,00 -1,20 mlHg sedangkan kelompok kontrol K- adalah 1,57 mlHg, Hasil uji *t-paired* menunjukkan ada perbedaan bermakna volume kaki sebelum perlakuan dan setelah perlakuan dengan p : 0,00.

5.2. Pengaruh Perlakuan terhadap kadar ion nitrit

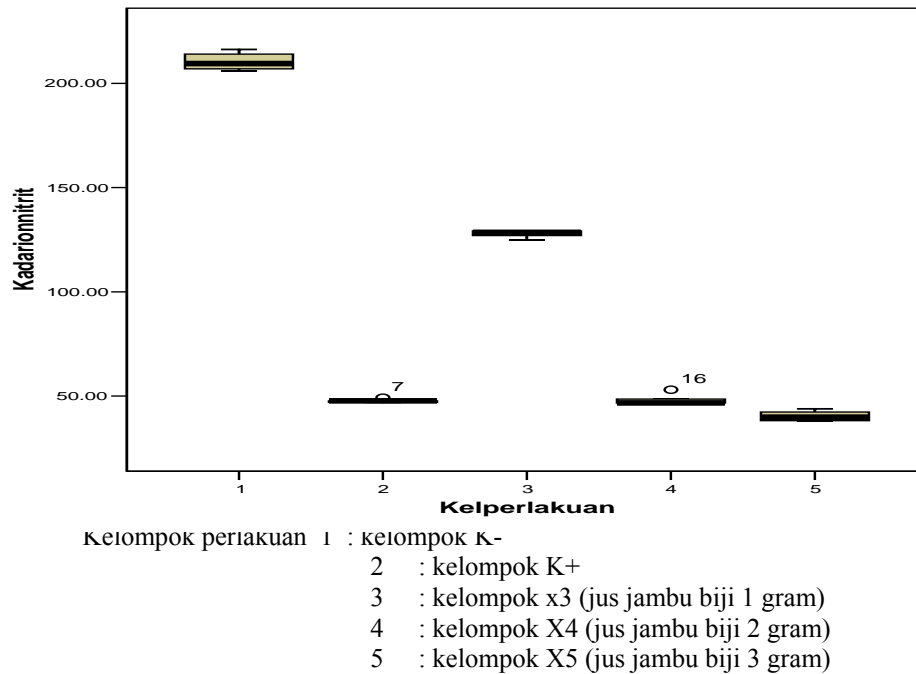
Uji deskriptif kadar ion nitrit serum *adjuvant induced arthritis* tikus

Wistar didapat hasil sebagai berikut:

Tabel 4. Hasil uji deskriptif kadar ion nitrit serum AIA kelompok perlakuan

Kelompok perlakuan			Statistik	Standard error
Kadar ion nitrit dalam $\mu\text{mol/ml}$	Non-terapi (K-)	Mean	210,6	2,00
		Median	209,5	
		Stan.Dev	4,47	
	Aspirin (K+)	Mean	47,7	0,4
		Median	47,7	
		Stan.Dev	0,92	
	Jus jambu biji 1 gram	Mean	127,7	0,83
		Median	128,5	
		Stan.Dev	1,87	
	Jus jambu biji 2 gram	Mean	48,2	1,2
		Median	46,7	
		Stan.Dev	2,79	
	Jus jambu biji 3 gram	Mean	40,2	1,2
		Median	39,8	
		Stan.Dev	2,6	

Tabel diatas menunjukkan nilai *mean* kadar ion nitrit pada kelompok non terapi adalah 210,6 $\mu\text{mol/ml}$ dan kelompok aspirin adalah 47,7 $\mu\text{mol/ml}$. Kadar ion nitrit kelompok aspirin hampir sama dengan kelompok jus jambu biji 2 gram (48,2 $\mu\text{mol/ml}$), lebih kecil dari kelompok jus jambu biji 1 gram (127,7) dan lebih besar dari kelompok jus jambu biji 3 gram (40,2 $\mu\text{mol/ml}$).



Grafik 2. Boxplot kadar ion nitrit serum AIA dalam $\mu\text{mol/ml}$

Dari gambar 2, boxplot diatas menunjukkan kadar ion nitrit serum ($\mu\text{mol/ml}$) terdistribusi normal pada kelompok 2 (aspirin), kelompok 3 (jus jambu biji 1 gram) dan kelompok 4 (jus jambu biji 2 gram), pada kelompok 1

(K-) dan kelompok 5 (jus jambu biji 3 gram/hari) tidak terdistribusi normal ditunjukkan dengan nilai *Wisker* tidak terbagi secara simetris.

Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* didapatkan kelompok perlakuan dengan $p: 0,03$, sehingga dilakukan transformasi data dan diperoleh hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* pada semua kelompok dengan nilai $p > 0,05$. Uji homogenitas Levene test pada median $p : 0,30 > 0,05$ untuk itu uji beda yang digunakan adalah *One Way Anova*, dengan hasil uji $p: 0,00 < 0,05$. Nilai ini menunjukkan ada perbedaan bermakna kadar ion nitrit serum tikus AIA antara kelompok perlakuan. Dari hasil uji menunjukkan minimal ada satu kelompok yang berbeda, uji LSD dihasilkan nilai p sebagai berikut

Tabel 5. Nilai p kadar ion nitrit AIA dengan uji LSD

Kelompok perlakuan	N	1	2	3	4	5
K- (1)	5	-	0,00	0,00	0,00	0,00
K+ (2)	5	0,00	-	0,00	0,29	0,00
Jus jambu biji 1 gram (3)	5	0,00	0,00	-	0,00	0,00
Jus jambu biji 2 gram (4)	5	0,00	0,00	0,00	-	0,00
Jus jambu biji 3 gram (5)	5	0,00	0,00	0,00	0,00	-

Dari tabel diatas menunjukkan kelompok kontrol (K-) berbeda dengan kelompok perlakuan lainnya dengan nilai $p: 0,00 < 0,05$. Ditemukan kelompok kontrol (K+) tidak berbeda dengan kelompok 4 (jus jambu biji 2 gram) dengan nilai $p: 0,29 > 0,05$.

5.2. Pengaruh perlakuan terhadap gambaran histopatologik panus

Menggunakan uji deskriptif untuk melihat skor ukuran panus didapatkan hasil sebagai berikut

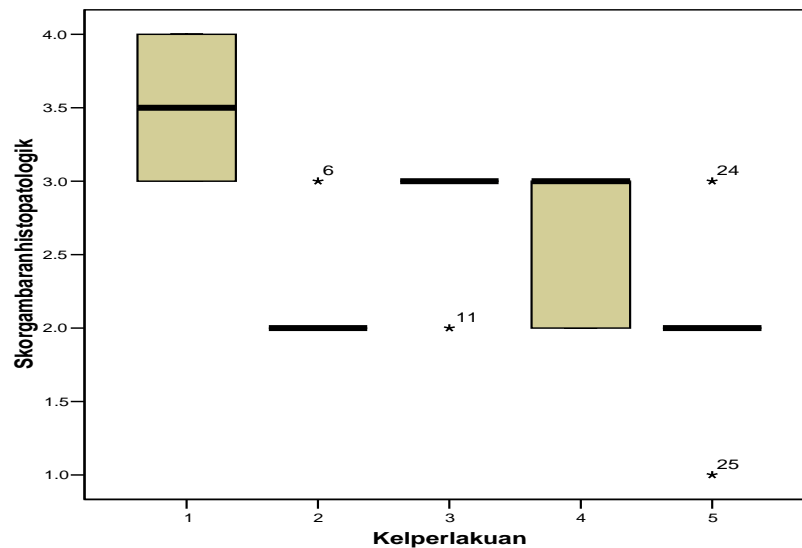
Tabel 6. Hasil uji deskriptif skor ukuran panus sendi AIA tikus Wistar

		Kelompok perlakuan	Statistik	Standard error
Skor ukuran panus sendi	Non-terapi (K-)	Mean	3,5	0,2
		Median	3,5	
		Stan.Dev	0,5	
	Aspirin (K+)	Mean	2,2	0,2
		Median	2	
		Stan.Dev	0,4	
	Jus jambu biji 1 gram	Mean	2,8	0,2
		Median	3	
		Stan.Dev	0,4	
	Jus jambu biji 2 gram	Mean	2,6	0,2
		Median	3	
		Stan.Dev	0,5	
	Jus jambu biji 3 gram	Mean	2	0,3
		Median	2	
		Stan.Dev	0,7	

Pada tabel 6 diatas, menunjukkan nilai *mean* skor ukuran panus sendi masing-masing kelompok perlakuan adalah pada kelompok non-terapi (K-) dengan mean skor ukuran panus paling besar (skor: 3,5) dibandingkan kelompok aspirin (K+) yaitu skor: 2,2. Kelompok aspirin memiliki skor yang sama dengan kelompok jus jambu biji 3 gram (skor:2), tetapi lebih rendah dari kelompok jus jambu biji 1 gram (skor:2,6) dan 2 gram (skor:2,8).

Skor median ukuran panus menunjukkan pada kelompok non-terapi paling tinggi (skor: 3,5) dan kelompok aspirin yaitu skor: 2 nilai ini sama dengan kelompok jus jambu biji 3 gram. Sedangkan kelompok jus jambu biji 1 gram dan 2 gram lebih tinggi dari skor ukuran panus pada kelompok aspirin (skor:3).

Dari hasil uji deskriptif dapat digambarkan, makin tinggi skor ukuran panus berarti derajat kerusakan sendi makin tinggi dan penelitian ini menunjukkan derajat kerusakan sendi yang paling tinggi pada kelompok non-terapi (K-). Pada kelompok terapi menunjukkan kerusakan sendi pada kelompok jus jambu biji 1 gram dan 2 gram hampir sama, sedangkan kerusakan sendi setelah terapi aspirin sama dengan terapi jus jambu biji 3 gram.



keterangan:

Kelompok perlakuan 1 : kelompok K-

6 : kelompok K+

7 : kelompok x3 (jus jambu biji 1 gram)

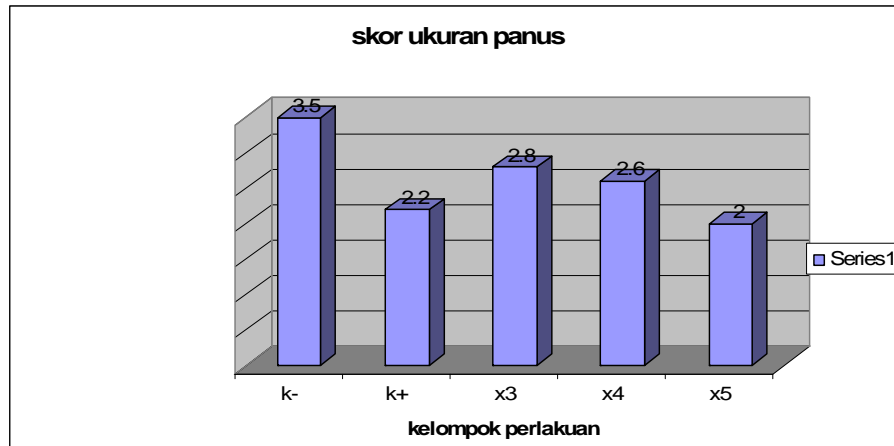
8 : kelompok X4 (jus jambu biji 2 gram)

9 : kelompok X5 (jus jambu biji 3 gram)

Grafik 3. Boxplot skor ukuran panus sendi AIA tikus Wistar

Gambar boxplot pada grafik 3, memperlihatkan letak median tidak berada ditengah kotak pada kelompok 4 (jus jambu biji 2 gram), nilai Wisker tidak terbagi secara simetris keatas dan kebawah, hal ini menunjukkan data tidak terdistribusi secara normal dan ditemukan nilai ekstrim pada kelompok 2,3 dan 5.

Gambar pada grafik 4 menunjukkan mean skor ukuran panus yang paling tinggi pada kelompok kontrol K- (skor: 3,5) dan yang paling rendah kelompok jus jambu biji 3 gram (skor: 2).



Grafik 4. Skor panus sendi AIA kelompok perlakuan

Mean skor aspirin sebagai kelompok kontrol K+ menunjukkan skor lebih tinggi (skor:2,2)dari kelompok jus jambu biji 3 gram (skor:2). Kelompok jus jambu biji 2 gram dan kelompok jus jambu biji 3 gram grafiknya lebih tinggi dari kelompok aspirin. Hasil ini menunjukkan dosis pemberian jus jambu biji yang tinggi (3 gram/hari) menghasilkan efek menghambat pertumbuhan panus pada sinovium lebih baik.

Skor *mean ranking* ukuran panus pada kelompok K- mencapai skor :21,20 dan kelompok aspirin skor: 8,60 adapun kelompok jus jambu biji 3 gram menunjukkan skor ukuran panus lebih rendah (skor: 7,50) dari aspirin

dan kelompok jus jambu biji 1 gram dan 2 gram dengan skor ukuran panus lebih tinggi (skor: 14,90 dan 12,80).

Tabel 7. Rerata ranking mean skor panus sendi AIA tikus Wistar

	Kelperlakuan	N	Mean Rank
Skor gambaran histopatologik panus	K-	5	21.20
	K+	5	8.60
	Jus jambu biji 1 gram	5	14.90
	Jus jambu biji 2 gram	5	12.80
	Jus jambu biji 3 gram	5	7.50
	Total	25	
Asym. Sig			p : 0,01

Hasil uji beda antar kelompok menggunakan *Kruskal-Wallis*. ditunjukkan dengan nilai $p: 0,011 < 0,05$.

Tabel rerata ranking skor ukuran panus sendi AIA tikus Wistar menunjukkan ukuran panus yang menginvasi sendi, semakin tinggi ranking mean menunjukkan semakin tinggi presen ruang sinovium yang terinvasi oleh panus yang berarti pula makin tinggi derajat kerusakan sendi. Dari hasil uji *Kruskal –Wallis* menunjukkan ada perbedaan ukuran panus pada kelompok perlakuan, yang memberi makna minimal ada satu kelompok yang berbeda. Hasil uji *Mann-Whitney* terhadap kelompok perlakuan pada skor ukuran panus sebagai berikut

Tabel 8. Nilai p skor ukuran panus sendi AIA tikus dengan uji LSD

Kelompok perlakuan	N	1	2	3	4	5
K- (1)	5	-	0,01	0,05	0,03	0,01
K+ (2)	5	0,01	-	0,07	0,22	0,61
Jus jambu biji 1 gram (3)	5	0,05	0,07	-	0,51	0,07
Jus jambu biji 2 gram (4)	5	0,03	0,22	0,51	-	0,17
Jus jambu biji 3 gram (5)	5	0,01	0,61	0,07	0,17	-

Tabel 8 diatas menunjukkan kelompok non-terapi (K-) berbeda dengan kelompok terapi (aspirin dan jus jambu biji). Kelompok aspirin tidak berbeda dengan kelompok jus jambu biji 1 gram, 2 gram dan 3 gram. Hasil ini menunjukkan 1 gram jus jambu biji berpengaruh terhadap gambaran histologik panus.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian terdahulu, menggunakan jambu biji untuk mengetahui efek perbaikan profil lipid dan peningkatan antioksidan darah pemuda sehat serta efek terhadap oksidasi lipid dan ketahanan eritrosit tikus *Diabetes mellitus*.

Sedangkan penelitian ini melakukan pemberian jus jambu biji 1,2 dan 3 gram per hari selama 14 hari, dibandingkan dengan kelompok tanpa terapi (K-) dan terapi aspirin 67,5 mg/hari (K+) untuk melihat perubahan volume kaki, kadar ion nitrit dan gambaran panus sendi *adjuvant induced arthritis* tikus Wistar.

6.1. Pengaruh imunisasi CFA pada *Adjuvant induced arthritis*

Hasil uji *t-paired* terhadap volume kaki menunjukkan ada perbedaan bermakna volume kaki awal dengan volume kaki setelah imunisasi, nilai $p : 0,01$. Hasil ini menggambarkan ada pengaruh imunisasi CFA terhadap volume kaki pada sampel tikus.

Meningkatnya volume kaki setelah imunisasi adalah manifestasi klinik dan karakteristik yang ditunjukkan dengan fenotipe bengkak pada sendi kaki *adjuvant induced arthritis*. Bengkak sendi merupakan peradangan (inflamasi) pada sinovial. Inflamasi sinovial diduga juga terjadi pada vaskuler yang menyebabkan platelet, fibrin dan hipoksia sel, mengakibatkan penyumbatan aliran darah, neovaskularisasi, dan pada akhirnya terjadi proliferasi sel yang

memacu hipertropi dan edema pada sendi. Proliferasi dihubungkan dengan infiltrasi sel imun dan sinovitis, menyebabkan sel tumbuh dan membelah secara abnormal memacu hiperplasia sinovium disertai akumulasi cairan dan pertumbuhan fibroblas.⁴⁻⁷

6.2. Pengaruh perlakuan terhadap kadar ion nitrit

Berdasarkan penelitian ini menunjukkan bahwa ada perbedaan bermakna kadar ion nitrit kelompok kontrol (K-), kelompok kontrol (K+) dan kelompok perlakuan jus jambu biji 1-3 gram/hari dibuktikan dengan uji *One Way Anova* nilai $p: 0,00$. Dilanjutkan uji LSD diketahui kadar ion nitrit kelompok kontrol (K+) tidak berbeda dengan kelompok perlakuan jus jambu biji 2 gram/hari ditunjukkan dengan nilai $p: 0,29$. Pada kelompok non-terapi (K-) menghasilkan kadar ion nitrit paling tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan (K+, dan pemberian jus jambu biji 1-3 gram/hari). Terapi aspirin yang diberikan mampu menghambat produksi ion nitrit sama dengan pemberian jus jambu biji 2 gram/hari.

Hasil yang serupa telah dilaporkan oleh penelitian terdahulu bahwa imunisasi CFA pada tikus meningkatkan kadar NO plasma 2 kali lebih besar dari tikus normal (kontrol negatif) dan meningkat 4-5 kali dari normal (K-) setelah fase skunder (12-22 hari pasca imunisasi CFA). Penelitian yang terpisah melaporkan kadar NO pada penderita *arthritis rheumatoid* lebih tinggi ($98,8 \mu\text{mol/l} \pm 26,3$) dibandingkan kontrol sehat ($38,3 \mu\text{mol/l} \pm 9,1$).⁸⁻¹⁰

Nitrit oksida adalah mediator inflamasi penting pada AIA, diproduksi oleh berbagai tipe sel seperti makrofag dan sel endotel yang dipacu oleh i.NOS saat metabolisme L-arginin membentuk sitrulin. Pada inflamasi AIA, NO diproduksi sebagai bakterisidal dan juga memberi efek vasodilatasi dan sitotoksik. Nitrit oksida bersifat tidak stabil dan mudah berubah menjadi ion nitrat dan nitrit yang stabil. Pada AIA, produksi NO meningkat dan kelebihan NO dapat bereaksi dengan oksigen dan hidroksil yang dapat memfasilitasi mekanisme oksidasi membentuk peroksinitrit dan radikal hidrogen. Kedua radikal ini bersifat memacu kerusakan sel dan jaringan seperti kartilago dan komponen ekstraseluler, merusak respon faktor pertumbuhan kondrosit, meningkatkan apoptosis kondrosit, menghambat sintesis komponen matriks seperti proteoglikan dan kondrosit, kolagen tipe II, glikosaminoglikan baru dan metalloprotein, serta merusak basa DNA dan mekanisme repair DNA.^{29,38,39}

Pada tingkat seluler, NO yang berlebih menyebabkan deaminasi deoksinukleotida, memacu mutasi gen somatik yang dapat terjadi pada gen P53. Gen P53 berfungsi pada perbaikan mutasi, pengaturan pertumbuhan sel, mekanisme repair dan apoptosis. Gen berperan penting pada AIA, mutasi gen dapat memperburuk penyakit. Diduga mutasi gen disebabkan oleh faktor lingkungan seperti serangan radikal bebas atau virus. Mutasi pada gen P53 telah diketahui menjadi prolog penyakit AIA yang terjadi selama perkembangan penyakit, menyebabkan pengaruh besar pada kerusakan sel, dan dihubungkan dengan invasi panus pada sinovium, kartilago dan tulang.⁴²

6.3. Pengaruh perlakuan terhadap gambaran histopatologik panus sendi AIA

Berdasarkan hasil pemeriksaan gambaran histopatologik panus sendi AIA, menggambarkan derajat kerusakan yang tertinggi terjadi pada kelompok kontrol K- dengan *mean* skor ukuran panus adalah : 3,5 dan *rank mean* yaitu skor 21,20. *Mean* skor kelompok kontrol (K+) adalah 2,20 dengan *rank mean* skor 2. Perlakuan jus jambu biji 1 gram/hari dan 2 gram/hari memiliki *mean* skor lebih tinggi dari kelompok K+ yaitu 2,80 dan 2,60 dengan skor median sama (skor: 3). Adapun perlakuan jus jambu biji 3 gram memiliki *mean* skor lebih kecil dari kelompok K+ yaitu skor 2. *Mean* skor ukuran panus paling kecil dari semua kelompok penelitian adalah kelompok perlakuan jus jambu biji 3 gram/hari. Hasil uji *Kruskal-Walis* menunjukkan ada perbedaan bermakna ukuran panus kelompok kontrol K- dengan kelompok perlakuan dibuktikan dengan $p = 0,01$. Dilanjutkan uji *Mann-Whitney* dan didapatkan hasil bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna ukuran panus antara kelompok perlakuan ($p > 0,05$) yaitu K+, perlakuan jus jambu biji 1 gram/hari, 2 gram/hari dan 3 gram/hari.

Panus merupakan lapisan sel dari akumulasi sinoviosit, sel limfosit, sel plasma, sel mast dan cairan sinovial yang menebal bersama fibroblas (dipacu oleh *GF*) membentuk jaringan yang bersifat destruktif. Reaksi jaringan panus dengan enzim yang diekskresi oleh sinovial, akan menyebar pada permukaan sendi dan merusak elemen sendi, menyerang sinovial, hialin kartilago, kolagen dan tulang lunak, hingga permukaan tulang dan menyebabkan deformitas.⁴⁻⁷

6.4. Pengaruh aspirin dan jus jambu biji pada AIA

Berdasarkan hasil penelitian ini menggambarkan, perlakuan aspirin 67,5 mg/hari selama 14 hari berefek positif pada inflamasi AIA. Diketahui ukuran volume kaki setelah perlakuan aspirin menjadi lebih kecil 1,11 mlHg dibandingkan sebelum perlakuan (1,53 mlHg), kadar ion nitrit lebih rendah (47,7 $\mu\text{mol/ml}$) dibandingkan kelompok kontrol (K-) yaitu 210,6 $\mu\text{mol/ml}$ dan *mean* skor ukuran panus lebih kecil (2,2 mlHg) dibandingkan kontrol (K-) skor 3,5 mlHg. Aspirin telah diketahui bekerja menekan produksi *prostaglandin* melalui penghambatan produksi enzim *cyclo-oxygenase*. Prostaglandin merupakan mediator inflamasi dan potensiasi mediator inflamasi lain seperti bradikinin dan histamin, memacu rasa nyeri yang hebat serta menyebabkan kemerahan pada sendi. Terhambatnya produksi prostaglandin menyebabkan rasa nyeri akibat peradangan berkurang yang berefek pada inflamasi. Berdasarkan hasil penelitian ini aspirin berefek mengurangi inflamasi, menghambat produksi NO dan invasi panus.¹⁰

Pengaruh yang sama diperoleh pada perlakuan dengan jus jambu biji selama 14 hari. Diduga perlakuan jus jambu biji mampu menghambat berbagai mekanisme yang memacu inflamasi kronik (setelah 21 hari imunisasi CFA). Setelah perlakuan jus jambu biji diketahui terjadi penurunan bengkak yang ditandai dengan ukuran volume kaki menurun. Dosis perlakuan jus jambu biji 3 gram/hari dan 2 gram/hari menghasilkan ukuran volume kaki lebih kecil (1,00 mlHg dan 1,09 mlHg) dibandingkan kelompok perlakuan aspirin

(1,10 mlHg) dan perlakuan jus jambu biji 1 gram/hari menghasilkan volume kaki lebih besar (1,12 ml Hg) dari perlakuan aspirin, sedangkan pada kelompok non-terapi (K-) ditemukan volume kaki paling tinggi (1,57 mlHg). Perlakuan jus jambu biji juga memberi pengaruh terhadap kadar ion nitrit. Ditemukan perlakuan jus jambu biji 1 gram/hari mampu menekan kadar ion nitrit lebih rendah (127,70 $\mu\text{mol/ml}$) dari kelompok kontrol K- (210,60 $\mu\text{mol/ml}$). Perlakuan jus jambu biji 2 gram/hari menghasilkan kadar ion nitrit lebih tinggi (48,20 $\mu\text{mol/ml}$) dibandingkan perlakuan aspirin (47,70 $\mu\text{mol/ml}$). Berdasarkan hasil penelitian ini dosis perlakuan jus jambu biji 3 gram/hari menghasilkan kadar ion nitrit paling rendah (40,20 $\mu\text{mol/ml}$) dari semua kelompok perlakuan. Perlakuan jus jambu biji terhadap ukuran panus pada penelitian ini menggambarkan dosis pemberian jus jambu biji 1 gram/hari (*mean* skor : 2,80 mlHg) dan 2 gram/hari (*mean* skor: 2,60 mlHg) menghasilkan skor lebih tinggi dari *mean* skor perlakuan aspirin (2,20 mlHg) dan perlakuan jus jambu biji 3 gram/hari menghasilkan *mean* skor terendah (2,00 mlHg) dibandingkan semua kelompok perlakuan. Pada penelitian ini, diduga penurunan bengkak dihubungkan dengan terhambatnya produksi mediator inflamasi seperti prostaglandin, IL-1 dan TNF- α yang menentukan berlanjutnya proses inflamasi. Penurunan volume kaki (mlHg) dihubungkan dengan ukuran panus yang juga berperan sebagai antigen dan menyebabkan inflamasi berlanjut seperti yang terjadi pada kelompok kontrol K- yang ditunjukkan dengan peningkatan volume kaki.⁴⁻⁷

Diperkuat dengan penelitian terdahulu, *N-iminoethyl-L-lysine* (L-NIL) mampu menekan NO plasma mencapai kadar yang sama dengan kontrol mencit sehat (K-), terapi dosis tinggi menghambat perkembangan artritik, dilaporkan pula terjadi penurunan NO plasma dan urin setelah pengobatan, yang dihubungkan dengan menurunnya parameter inflamasi seperti bengkak pada hewan coba. Penelitian yang terpisah melaporkan, *alendronate* tidak menghambat proliferasi sinovial, infiltrasi sel inflamasi, dan destruksi kartilago. Prednisolon mampu menghambat proliferasi sinovial, infiltrasi sel inflamasi, dan destruksi kartilago ($p < 0,01$). Penelitian lain melaporkan, ada hubungan antara peningkatan kadar NO dan penurunan kadar vitamin E pada penderita *arthritis rheumatoid*.¹⁸⁻²⁰

Senyawa yang diduga berperan dalam jambu biji pada penelitian ini adalah quercetin, vitamin E, vitamin C, selenium, copper, *zinc*, likopen dan flavonid. Likopen diduga berperan dalam menghambat proliferasi sel melalui mekanisme fosforilasi tirosin reseptor, *growth factor*, meredam oksidan dan meningkatkan kerja antioksidan seperti mengurangi kerusakan oksidatif pada lipid, protein dan DNA, melalui mekanisme non-oksidatif dan melalui pengaturan fungsi gen seperti memperbaiki *gapjunction communication*. Quercetin telah diketahui berperan dalam menghambat aktivitas *cyclo-oxygenase* dan *lipo-oxygenase* sehingga mengurangi terbentuknya mediator inflamasi pada manusia dengan *arthritis rheumatoid*. Vitamin E adalah suatu antioksidan utama yang bersifat larut lemak. Penelitian terbaru menganjurkan

pemberian vitamin E sebagai anti-inflamasi dan mengurangi rasa sakit. Efektifitas vitamin E sebagai anti-inflamasi sama dengan obat anti inflamasi. Pemberian vitamin E dalam dosis yang kecil, berpengaruh signifikan pada penurunan rasa sakit, dianjurkan pemberian vitamin E sebagai anti inflamasi. Pemberian kombinasi selenium + vitamin E berpengaruh pada prostaglandin (substansi yang berpengaruh pada tekanan darah dan inflamasi). Masih ditemukan kontradiksi hasil penelitian tentang peran vitamin E sebagai anti-inflamasi berdasarkan studi RCT pada penderita *arthritis rheumatoid*.¹⁰⁻²³

Senyawa *Phenol flavonoid* diketahui memiliki kemampuan untuk memacu pengaruh vitamin C. Flavonoid + vitamin C memiliki kemampuan proteksi, pemeliharaan dan *repairing* sistem *vascular*. Studi eksperimen melaporkan terapi tunggal vitamin C melalui suntikan menurunkan bengkak dan mengurangi inflamasi pada manusia dengan *arthritis*. Penelitian yang berbeda telah membuktikan efek positif terapi dari kombinasi vitamin A + vitamin C + vitamin E + selenium pada semua tipe *arthritis*. Ditemukan kontradiksi penelitian sebagaimana dilaporkan studi kohort bahwa tidak ditemukan hubungan β -karoten, likopen, lutein/zeaxantin dan seng pada *arthritis*.²⁶⁻³⁴

Ellagic acid membantu stimulasi pembuatan glutathion. Lignin, vitamin C, vitamin E, kombinasi selenium + vitamin E dapat mengurangi radikal bebas dan berfungsi sebagai *scavenger*.²³

Jambu biji adalah buah yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh dan tidak memiliki efek samping. Berdasarkan hasil penelitian ini, diharapkan penggunaan pada manusia dengan kasus yang sama maka dosis yang dianjurkan adalah 156 gram/hari atau 2-3 buah ukuran sedang dari jenis jambu yang sama dengan penelitian ini. Diharapkan pula perlakuan jus yang digunakan sama dengan penelitian ini.

6.3. Keterbatasan dalam penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa kelemahan yaitu

- a. Pada penelitian tidak dilakukan pengukuran NO karena sifatnya yang tidak stabil, sehingga dilakukan pengukuran kadar ion nitrit sebagai hasil metabolisme NO yang lebih stabil.
- b. Tidak dilakukan pengukuran jumlah sel karena tidak terukur jumlahnya, sehingga tidak dapat dilakukan skoring.

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1. Simpulan

- Pemberian jus jambu biji berpengaruh dalam menghambat produksi NO yang diketahui melalui kadar ion nitrit serum AIA tikus Wistar.
- Pemberian jus jambu biji berpengaruh dalam menghambat invasi panus yang diketahui dari gambaran histopatologik panus sendi AIA tikus Wistar.

7.2. Saran

- Perlu penelitian lebih lanjut efek terapi jus jambu biji terhadap kadar NO jaringan.
- Perlu penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian jus jambu biji menggunakan variasi waktu untuk menganalisis variabel gambaran histopatologik proliferasi sel.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bratawijaya KG. *Imunologi Dasar: Autoimunitas*. 6th Jakarta: Gaya baru: 2004. p.218
2. Husney A, Crichlow RM and Shoors M. *What Happens To The Joint In Rheumatoid Arthritis*. Med Reviv. Am J. Rheumathol. 2004
3. Yongxiu H. *Effect of oral administration of type collagen on adjuvant arthritis in rat and its mechanism and compare the effect with those of Chinese traditional medicine Tripterygium Polyglycosida and administration similary*. Korean J. Med Sci. 2006
4. Prabowa S. Pengaruh stresor dingin terhadap proses peradangan pada arthritis ajuvan: penelitian eksperimental pada arthritis ajuvan (model hewan untuk arthritis rematoid). Tesis. Iptunair J. Pharm.. 2005;
5. Fletcher DS, Widmer WR, Luells S, Christen A, Orevillo C, Shah S, et al. *Theraupeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase does not Ameliorate the cronic inflammation and tissue damage associated with adjuvant induced arthritis in Rat*. N Jersey J. Pharm Med Chem. 2007;
6. Bae SC, Kim DY, Kim TH, et al. *Nitric Oxide (NO) in inflammatory Arthritis*. Korean J. Med 1997;52 : 32-41
7. Bresnihan B, Cunnanc G, Youssef P, yanni G Fitzgerald and Mulherin D. *Microscopic measurement of sinovial membrane inflammatory in rheumatoid arthritis: Proosal the evaluation of tissue samples by quantitative analysis*. Brithis J. Rheum. 1998; 37: 636-72
8. Wallace JL. *Nitric Oxide as regulatory of inflammatory processes*. Am J. Med Inst Cruz. 2005; 100: 5-9
9. Huang Z, Back LJG, Goyal M, Azizi F, King SD. And Kim. Shapiro DB. *Nitric oxide (NO) binding to oxygenerated hemoglobin under physiological conditions*. Am J. Bhio Biops Acta. 2001; 1568: 252 – 60
10. Dipiro JT. *Pharmacotherapy, a pathophysiologic approach*. Am J. Conn Appl and Lange. 1999: 1427- 40

11. Lakhanpal P and Rai KD. *Quercetin : a versatile flavonoid*. Int J. Med. 2007; 2(2):<http://www.geocities.com/agnihotrimed.htm>
12. Knek P, Heliovaara M, Aho K, et al. *A: serum selenium, sera of-tocopherol and risk rheumatik arthritis*. J. Epid. 2000; 11. 402-05
13. Cerhan JR, Saag KG, Merlino, Kenneth G, Linda A, Mikuls, et al. *A antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in chart of older women*. Am J. Epid. 2003. 157 : 345-54.
14. Darlington LG. *Rheumatoid arthritis: diet and human immune function*. Edited by David A, Hughes, L. Gail Darlington and Adrianne Bendich. . New Jersey J. 2004: 273-77
15. Whitney EN and Rolfes SR. *In Diet and arthritis. Under Standing Nutrition* Wads. 2002.p. 235-38
16. Sang CB, Soo-Jim K and Mi-Kyung S. *Inadequate antioxydant nutrient intake and altered plasma status of rheumatoid arthritis pasients*. Korean J. Dept. Int Med Dev Rheum. 2001:
17. Rahmat A. Vitamin C dan Artritis. Ruler and reseach Program. Afr J of food Agr .Nutrition and develompment.2006.6(2)
18. Helmy M, Shohayeb M, Helmy MH and Basiouni EA. *Antioxidants as adjuvant therapy in rheumatoid disease a preliminary study*. Am J. Arz-Fosh. 2000; 5: 293-98
19. Center PH, Wider B and Ernest E. Vitamins And Arthritis. Abstract Dept of Complementary and Sch university of Exander
20. Tanaka M, Mitamura M and Xiang A. *Effect of alendronate and prednisolone an model of rheumatoid arthritis in Mice*. Japn J. Tox Pathol. 2007
21. Comstok GW, Hofman SC, Heilzsoerkj, et al. *Serum consentration α -tocopherol, β -caroten and retinol presiding the diagnosses of rheumatoid arthritis and systemic erythematosus*. Ann Rheum J. Dis. 1997; 56: 233-35
22. Sudrajad SS dan Gunawan. Likopen (Lycopene). Giz Med Ind. 2003. 2(5).p.7-8
23. O'Dell JR. *Anticytokine therapy- a new era in the treatment of rheumatoid arthritis*. New Engl J. Med. 1999; 340: 310-312

24. Plenge RM. *Mapping Gen: TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis- a genomewide study*. Am J. Med. 2007; 20 : 357-61
25. Rahmat A, Mohd FZ and Zarida H. *The effect of guava (Psidium Guajava) consumption on total antioxidant and lipid profile in normal make youth*. Malays J. Agric Nutr. 2006:6
26. Fonnies EH. Efek jus jambu biji (Psidium Guajava L) dalam menghambat peroksidasi lipid dan meningkatkan ketahanan membran eritrosit tikus yang diperlakukan diabetes . mellitus. Tesis Universitas Brawijaya. Malang. 2007
27. Heinnarmen J. Dalam Manfaat medis jambu biji bagi kesehatan: terapi jambu biji. Khasiat jambu biji: Jakarta. Pustk.2003. P. 35-37
28. www.Asiamaya.co./jambubiji.html
29. Holm B, Svelander L, Lorentzen JC and Buchtt A. *Pathogenetic studies adjuvant induced arthritis*. Scand J. Immunol. 2001; 54:599-605
30. DCD. *Prevalence Of Doctor-diagnosed arthritis and arthritis atribut activity limitation-United State*. ERRATA. 2005. <http://www.cdc.gov/arthritis>.
31. Mili F, Helmick CG and Mariarty DG. *Health releated quality of life among adult reporting arthritis: Analysis of data from the behaviour risk factor surveillence system*. Am J Rhemathol. 2003; 30: 160-66
32. Tsou IYY. *Rheumatoid Arthritis, Hands*. Article. Singapura J. Med. 2007.10
33. Visioli F, Anthony S, Weijan Z, et al. *Redox report*. 2002. 5. p.223-227
34. Hellman DB and Stone JH. *In Arthritis and musculoskletal disorders. Patology* 2th:2004. p. 778-81
35. Ackerman and Rosai. *Surgical bone and joint: Rheumatoid arthritis*. 9th. New York. Mosby . 2004. p. 2202
36. Kattryn L, Cauca Mc SE and Huchter. *Pathophysiology the Biologic Basic for Desease in Adulth and Children* 2th. Arthritis Rheumatoid. Elvers Mosby. 2006. p.426.
37. Crawther CL and Kathryn LM KMC. *Alteration of musculoskletal function: Rheumatoid arthritis*. 2004. p.1525-1528.

38. Weigbert BJ, Lang T, Wilkinson WD, Pisetsky DS and Clair EWST. *Serum, Complexities of interpreting nitric oxide measure urinary and salivary nitric oxide in rheumatoid arthritis*. Am J. Toxcl. 2006
39. Jose A, Gonzalvez N, Benayas CG and Arenas J. *Semiautomated measurement of nitrate in biology fluids*. Europ J. Clin Chem. 2003; 17:7-9
40. Dewi S. Stres oksidatif antioksidan dan vitamin dan kesehatan. Ilmu Kes dan Ked. Kel J. Santika Med. 2005; 2: 238-58
41. Burke. A E, Gambhir JK, Lali P dan Jain AK. *Correlation between blood antioxidant level and lipid perokxidation in rheumatic arthritis*. Am J. Clin Bioch.1997; 30: 351-355
42. Jhon S. *Mapping arthritis high resolution linkage and association mapping identifies a novel rheumatoid arthritis susceptibility locus homologous to one linked to two rat model of inflammatory arthritis*. Sweden J. Oxf Epid unit rheumatol. 2007. 10: 1901-06
43. Bender DA. *Introduction to nutrition and metabolism*. London. Talor and Francs Press.1997. p. 28-32
44. Helliwell B And Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicin*. 1999;
45. Deaney CL, Feeyik, Forrest CM. *Level of lipid peroxidation products in acronic inflammatory disorder*. Res Comm. Mol J. Patol Prharmacol. 2001; 110: 87-95
46. Hasan NG, Hadi RA, Al-rawi ZS, Padron VA, Sthohs SJ: *The glutathion defense system in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. J. Appoltoxicol.2001; 21: 672-73
47. Kilzitung A, Coagil and Cerrahalur L. *Carnitine and antioxidant level in patients with rheumatoid arthritis*. Am J. Rheumathol. 1998; 27: 441-45
48. Stupack DG, Storgard CM and Cheresch DA.. *A Role For Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis*. Braz J. Med and Biomol. 1999; 32 : 573-81
49. Sutrisna EM. Uji efek penurunan kadar glukosa darah ekstrak air buah jambu biji (*Psidium Guajava* L) pada kelinci.Ind J Pharm .2005; 6: 23-7

50. Seemayer CA, Distlero, Kunchem S, et al. *WHO Colaborating center for molecular biology and novel theraupic strategics of rheumatoid disease*. Swizland J. Rheumathol. 2001; 60: 309-18
51. Edmonds SE, Winyard PG, Gua R. *Putative analgeric activity of repeated oral doses of vitamin E in the treatment of rheumatoid arthritis*. Ann Rheum J.1997; 56: 649-55
52. Patricia B. Review : *Prehistory arthritis*. Am J. Anthro. 2006; 92: 67-91
53. Sudigdo S dan Sofyan I. *Dasar – Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. 2th. Jakarta. 2002.